Untersuchungen zum anaeroben Energiestoffwechsel der Herzmuschel *Cardium tuberculatum*: Die Rolle der drei terminalen Dehydrogenasen der Glykolyse, D-Lactat-, Octopin- und Alanopindehydrogenase, bei biotopbedingter und funktioneller Anaerobiose.

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Georg Meinardus-Hager
aus
Brake/Unterweser

Bonn 1986

Untersuchungen zum anaeroben Energiestoffwechsel der Herzmuschel Cardium tuberculatum: Die Rolle der drei terminalen Dehydrogenasen der Glykolyse, D-Lactat-, Octopin- und Alanopindehydrogenase, bei biotopbedingter und funktioneller Anaerobiose.

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Georg Meinardus-Hager
aus
Brake/Unterweser

Bonn 1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523710_0007

Herrn Privat-Dozent Dr. G. Gäde danke ich für die Anregung des Themas und sein Interesse an dieser Arbeit, sowie dafür, daß er in Zusammenhang mit einem Forschungsprojekt der Deutschen Forschungsgemeinschaft die Anfertigung der Arbeit ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. R. Keller, Institut für Zoophysiologie der Universität Bonn, Herrn Prof. Dr. M. Grieshaber, Institut für Zoologie IV der Universität Düsseldorf und besonders Frau Dr. G. Nardi, Laboratorio di Biochimica, Stazione Zoologica di Napoli, Italien, gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme in ihren Instituten und ihre Unterstützung.

Auch Herrn Prof. Dr. A. Betz danke ich herzlich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu referieren.

Weiterhin möchte ich all jenen danken, die durch tatkräftige Hilfe und nützliche Anregungen den Fortgang der Arbeit unterstützt haben.

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. G. Gäde
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Betz

Tag der mündlichen Prüfung: 27./28. Februar 1986

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einführung in die Problematik des anaeroben Energiestoffwechsels

I. Sauerstoffknappheit als prägendes Merkmal für Biotop und Stoffwechsel 1
II. Die Möglichkeiten anaerober Energiegewinnung 2
1. Die aerobe und anaerobe Glykolyse 3
2. Die Fumaratreduktase-Reaktion 4
3. Die Phosphagene 5
III. Wege des anaeroben Energiestoffwechsels 5
1. Das Schema des anaeroben Stoffwechsels bei Invertebraten 7
2. Spezielle Probleme des anaeroben Energiestoffwechsels 8
3. Spezifische Anforderungen biotopbedingter und funktioneller Anaerobiose 9
IV. Die Regulation des anaeroben Stoffwechsels 11
1. Die Glykogenphosphorylase 11
2. Die Phosphofructokinase 12
3. Die Pyruvatkinase und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase 13
4. Der "energy charge" 13
V. Die Bedeutung der Pyruvatreduktasen 14
1. Die Lactatdehydrogenase 14
2. Die "Opindehydrogenasen" 15
3. Isoenzyme 15
4. Die Rolle der Produkte der Pyruvatreduktasen 16

B. Der Energiestoffwechsel der Herzmuschel C. tuberculatum während biotopbedingter Anaerobiose und seine Modifikation bei Einsatz spezifischer Stoffwechselinhibitoren

I. Der Einfluß bestimmter Faktoren auf den anaeroben Stoffwechsel 19
II. Aufbau, Durchführung und Auswertung der Versuche 20
1. Versuchstiere 20
2. Enzyme, Cosubstrate und Chemikalien 20
3. Versuchsaufbau 21
a) Verschiedene Perioden anaerober Inkubation 21
b) Anaerobe Inkubation nach Injektion von Stoffwechselinhibitoren 21
4. Entnahme und Lagerung der Gewebe 22
5. Bereitung der Perchlorsäure-Extrakte 23
6. Vorbereitungen zur Glykogenbestimmung 23
7. Metabolitbestimmungen 24
8. Statistische Auswertung der Daten 25
III. Ergebnisse 25
1. Zeitabhängige Veränderungen von Metabolitkonzentrationen bei biotopbedingter Anaerobiose 28
2. Die Wirkung von Stoffwechselinhibitoren auf die Bildung von Endprodukten im Verlauf der biotopbedingten Anaerobiose 32
a) Die Wirkung des Glykolyseinhibitors Jodacetat 33
b) Die Wirkung des Transaminaseinhibitors Aminooxyacetat 33
c) Die Wirkung des PEPCK-Inhibitors 3-Mertcaptopicolinsäure 35
3. Freie Aminosäuren 35
4. Die Energieausbeute des anaeroben Stoffwechsels 35
a) Der Energieverbrauch in den verschiedenen Perioden biotopbedingter Anaerobiose 37
b) Die Wirkung der Stoffwechselinhibitoren auf den Energieverbrauch 37
IV. Diskussion 39

Seite

1. Das Schema des Stoffwechsels der Herzmuschel C. tuberculatum bei biotopbedingter Anaerobiose 39
2. Der Energieverbrauch während biotopbedingter Anaerobiose 39
3. Die Rolle des D-Lactats als Stoffwechselendprodukt bei biotopbedingter Anaerobiose 44
45

C. Der Energiestoffwechsel der Herzmuschel C. tuberculatum während funktioneller Anaerobiose (intensiver Muskeltätigkeit) bei aeroben und anaeroben äußeren Bedingungen

I. Die Fluchtbewegungen und ihre Auswirkungen auf den Organismus 48
II. Material und Methoden 49
1. Versuchstiere 49
2. Enzyme, Cosubstrate und Chemikalien 49
3. Versuchsaufbau 50
a) Aufteilung des muskulösen Weichkörpers in verschiedene Partien 50
b) Metabolische Veränderungen bei fortgesetzter Muskeltätigkeit 50
c) Muskeltätigkeit nach anaerober Vorinkubation 51
4. Messung der Enzymaktivitäten 51
5. Entnahme und Lagerung der Gewebe, Bereitung der Perchlorsäureextrakte und Bestimmung der Metabolite 51
6. Statistische Auswertung der Daten 52
III. Ergebnisse 52
1. Veränderungen der Metabolitkonzentrationen 54
2. Energieausbeute des anaeroben Stoffwechsels 57
IV. Diskussion 61
1. Die Rolle des Octopins als Endprodukt der anaeroben Glykolyse 62
2. Der ATP-Verbrauch bei funktioneller Anaerobiose 64
3. Die Umsatzrate der Glykolyse bei funktioneller Anaerobiose 64

D. Der Erholungsstoffwechsel der Herzmuschel C. tuberculatum nach biotopbedingter und funktioneller Anaerobiose: Sauerstoffschuld und metabolische Veränderung

I. Die Bedeutung der Rückkehr zu den stoffwechselphysiologischen Bedingungen vor der Anaerobiose 67
II. Aufbau, Durchführung und Auswertung der Versuche 68
1. Versuchstiere 68
2. Enzyme, Cosubstrate und Chemikalien 68
3. Versuchsaufbau 69
a) Erholung nach biotopbedingter Anaerobiose 69
b) Erholung nach funktioneller Anaerobiose 69
aa) Erholung in aerobem Wasser 69
bb) Erholung in anaerobem Seewasser 69
cc) Erholung in anaerobem Seewasser nach anaerober Vorinkubation und anschließender Muskeltätigkeit in hypoxischem Wasser 70
4. Entnahme und Lagerung der Gewebe, Bereitung der Perchlorsäureextrakte und Bestimmung der Metabolite 70
5. Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs 70
6. Berechnung des Sauerstoffverbrauchs 71
7. Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks in der Hämolymphe 71
8. Statistische Auswertung der Daten 72
III. Ergebnisse 72
1. Verhalten während und nach anaerober Inkubation und Muskeltätigkeit 72
2. Sauerstoffverbrauch 72

Seite

3. Sauerstoffverbrauch nach biotopbedingter Anaerobiose 77
4. Sauerstoffverbrauch nach funktioneller Anaerobiose 81
5. Der Sauerstoffpartialdruck in der Hämolymphe 83
6. Metabolische Veränderungen während der Erholung nach biotopbedingter Anaerobiose 83
7. Metabolische Veränderungen während der Erholung nach funktioneller Anaerobiose 87
a) Aerobe und anaerobe Erholung aerob gehaltener Muscheln 87
b) Anaerobe Erholung anaerob vorinkubierter Muscheln 90

IV. Diskussion 90
1. Sauerstoffverbrauch 91
2. Erholung nach biotopbedingter Anaerobiose 92
3. Erholung nach funktioneller Anaerobiose 96

E. Partielle Reinigung und Charakterisierung der kinetischen Eigenschaften der D-Lactat-, Octopin- und Alanopindehydrogenase aus Muskelgeweben von C. tuberculatum

I. Die Funktion der Pyruvatreduktasen 100
II. Reinigungsmethoden und Reaktionsbedingungen 100
1. Tiermaterial 100
2. Chemikalien 100
3. Bestimmung der Enzymaktivitäten 101
4. Proteinbestimmungen 101
5. Reinigung der Enzyme 103
6. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese 104
7. Bestimmung des Molekulargewichts 105
8. Bestimmung der kinetischen Parameter 105
9. Bestimmung der appparenten Gleichgewichtskonstanten (app. K_{eq}) 106

III. Ergebnisse 106
1. Optimierung der Testbedingungen 106
2. Reinigung der Dehydrogenasen 106
3. Elektrophorese 109
4. Bestimmung des Molekulargewichts 110
5. Die Auswirkungen des pH-Wertes auf die Enzymaktivität 110
6. Substratspezifität 113
a) 2-Oxocarboxylsäuren 113
b) Aminosäuren 113
7. Kinetische Parameter 113
8. Hemmung der Enzymaktivitäten 116
9. Die apparenten Gleichgewichtskonstanten 119

IV. Diskussion 119
1. Die Pyruvatreduktasen und ihre Eigenschaften 119
2. Die Beeinflussung der Enzymaktivitäten durch die kinetischen Eigenschaften 122

F. Untersuchungen zur Regulation der Glykolyse bei C. tuberculatum während biotopbedingter und funktioneller Anaerobiose

I. Die Anpassung der Glykolyserate an die Erfordernisse der biotopbedingten und funktionellen Anaerobiose 125
II. Aufbau, Durchführung und Auswertung der Versuche 126
1. Versuchstiere 126
2. Chemikalien 126
3. Versuchsaufbau 126

Seite

4. Extraktbereitung für die Messungen der Enzymaktivitäten 127
5. Bestimmung der Enzymaktivitäten 127
6. Extraktbereitung für fluorimetrische Messungen 129
7. Bestimmung der Metabolitkonzentrationen 129
8. Bestimmung des Aktivierungszustandes der Glykogenphosphorylase 130
9. Untersuchung der kinetischen Eigenschaften von PFK und PK 130

III. Ergebnisse 132
1. Enzymaktivitäten 132
2. Fluorimetrische Messungen 133
a) Gesamter Weichkörper 133
aa) biotopbedingte Anaerobiose 133
bb) funktionelle Anaerobiose 138
cc) aerobe Kontrolltiere von Mai und September 138
b) Fußmuskel 138
aa) biotopbedingte Anaerobiose 138
bb) funktionelle Anaerobiose 140
3. Die Massenwirkungsquotienten (MAR) 140
a) Gesamter Weichkörper 143
aa) biotopbedingte Anaerobiose 143
bb) funktionelle Anaerobiose 143
cc) Die MAR-Werte und das "Disäquilibrium" 143
b) Fußmuskel 144
aa) biotopbedingte Anaerobiose 144
bb) funktionelle Anaerobiose 144
4. Aktivierung der Glykogenphosphorylase 146
5. Die Regulation der PFK-Aktivität 146
6. Die Formen der PK und ihre Regulation 150
a) Gewebsspezifische Formen 150
b) Die Regulation der Aktivität 150
c) Veränderungen der PK bei biotopbedingter Anaerobiose 151
d) Simulierung der physiologischen Bedingungen bei Anaerobiose 151

IV. Diskussion 152
1. Die Kapazität der verschiedenen Energiestoffwechselwege 152
2. Der Einfluß verschiedener Enzyme auf die Glykolyserate 153
3. Die Aktivierung der Glykogenphosphorylase 156
4. Die Regulation der Phosphofructokinase 157
5. Die Regulation der Pyruvatkinase 158

G. Der Dualismus von D-Lactat- und Octopinbildung bei C. tuberculatum während biotopbedingter und funktioneller Anaerobiose

I. Die Charakteristika des Stoffwechsels bei biotopbedingter Anaerobiose 160
1. Der anaerobe Kohlenhydratstoffwechsel 160
2. Die Bildung von D-Lactat 161
3. Die Rolle des Phosphagens 163

II. Die Regulation der Glykolyse 164
1. Die Glykolyserate bei biotopbedingter Anaerobiose 164
2. Der Übergang von biotopbedingter zu funktioneller Anaerobiose 164

III. Die Bildung von Octopin bei funktioneller Anaerobiose 165

IV. Die physiologischen Vorteile der Octopin- bzw. Lactatbildung 166

H. Zusammenfassung 167

Literaturverzeichnis 170
Abkürzungsverzeichnis 180
Lebenslauf 181

A. Einführung in die Problematik des anaeroben Energiestoffwechsels

I. Sauerstoffknappheit als prägendes Merkmal für Biotop und Stoffwechsel

Die Topographie und die Klimazonen der Erde ergeben Gebiete, die untereinander z.B. bezüglich Temperatur, Feuchtigkeit, Ionenkonzentration, Nahrungs- und Sauerstoffangebot (meßbar als Sauerstoffpartialdruck Po_2) verschieden sind, aber in sich mehr oder minder einheitliche Umweltbedingungen aufweisen. Diese sog. Biotope sind die natürlichen Verbreitungsgebiete bestimmter Tierarten. Ein Tier ist an die speziellen Verhältnisse "seines" Biotops morphologisch, stoffwechselphysiologisch und/oder im Verhalten angepaßt. Neben dem Umweltfaktor Temperatur ist es besonders der Sauerstoffpartialdruck, der z.B. eine gezielte Anpassung des Stoffwechsels verlangt.
Der größte Teil der Tierarten besiedelt Biotope, die zu jeder Zeit eine gute Sauerstoffversorgung bieten. Der Stoffwechsel der meisten dieser Arten ist obligat aerob, d.h. von Sauerstoff abhängig, denn die vollständige katabolische Verbrennung von Nahrungsstoffen ermöglicht eine sehr effektive Nutzbarmachung der in der Nahrung enthaltenen Energie.
In Höhenluft oder stehendem Wasser z.B. herrscht ein reduzierter äußerer Sauerstoffpartialdruck. Eine Anpassung an diese sog. hypoxischen Bedingungen kann schon durch eine bloße Erweiterung der Speicherkapazität für Sauerstoff im Organismus erfolgen, die eine Aufrechterhaltung des internen Sauerstoffangebots für den Stoffwechsel bewirkt.
Bei den stark hypoxischen Bedingungen des Faulschlamms stehender Gewässer und des Erdbodens bei Nässe können jedoch Tierarten wie z.B. Anodonta, Tubifex oder Lumbricus nur deshalb überleben, weil ihr aerober Stoffwechsel durch Vorgänge ergänzt wird, die unabhängig vom Sauerstoff Energie bereitstellen können.
Extreme Lebensräume bezüglich der Sauerstoffverhältnisse sind auch der Verdauungstrakt und die Gallengänge von Säugern. In diesen Biotopen fehlt Sauerstoff immer gänzlich. Die darin parasitierenden Cestoden und Trematoden sind zu einer permanent sauerstoffunabhängigen Lebensweise gezwungen, für die Zebe et al. (1980) den Begriff "biotopbedingte Anaerobiose" einführten.

Ein Biotop mit zeitweise anaeroben Bedingungen ist für viele ihrer Bewohner die Gezeitenzone der Meere (Litoral). Für Tiere, die Sauerstoff nur aus dem Wasser und nicht aus der Luft aufnehmen können, wechseln sich mit dem semidiurnalen Rhythmus der Gezeiten regelmäßig aerobe Bedingungen während der Flut mit

anaeroben während der Ebbe ab. Besonders gravierend ist die anaerobe Situation für bestimmte litorale Muscheln, wie z.B. Austern und Miesmuscheln, die ihr auf Grund ihrer sessilen Lebensweise nicht entgehen können. Sie halten während der Ebbe zur Vermeidung des Austrocknens die Schalen fest geschlossen, wodurch jeglicher Gasaustausch unterbunden wird. Daher sind sie das bevorzugte Untersuchungsobjekt auf dem Gebiet der Anpassung an einen biotopbedingten Mangel an verfügbarem Sauerstoff geworden.
Bei biotopbedingter Anaerobiose ist der ganze Organismus einem verminderten Sauerstoffangebot unterworfen - eine andere Art zeitweiliger Anaerobiose kann in den schnell und stark kontrahierenden Muskeln fast aller Tierarten beobachtet werden, beispielsweise dem Skelettmuskel der Vertebraten, dem Mantelmuskel der Tintenfische, dem Schließmuskel schwimmender Muscheln oder dem Hautmuskelschlauch grabender Sipunculiden und Anneliden (siehe Übersichtsartikel von Gäde 1980a, Livingstone 1982, Grieshaber 1982). Treten diese Gewebe in Funktion, so hat dieser Vorgang eine plötzliche starke Erhöhung des Energiebedarfs zur Folge, der durch aerobe Stoffwechselvorgänge nicht mehr gedeckt werden kann, da entweder die Ausstattung des Gewebes mit Mitochondrien oder die "normale" Sauerstoffversorgung dieser Gewebe von außen nicht ausreicht. Es erfolgt daher in den Muskeln eine lokale anaerobe Energieerzeugung zur Deckung des momentan gesteigerten Energiebedarfs. Für diesen Prozeß prägten Zebe et al. (1980) den Begriff "funktionelle Anaerobiose".

Zusammenfassend kann man feststellen, daß die funktionelle Anaerobiose auf ein bestimmtes Gewebe, nämlich den Muskel, beschränkt ist und der kurzzeitigen Deckung eines vermehrten Energiebedarfs dient. Die biotopbedingte Anaerobiose ist dagegen zeitlich ausgedehnt und erfordert eine Anpassung des gesamten Organismus. Diese Anpassung erlaubt es dem Tier, Lebensräume zu besiedeln, in denen Sauerstoff immer oder zeitweise fehlt.

II. Die Möglichkeiten anaerober Energiegewinnung

Alle Tierarten, die sich an eine ganz oder teilweise anaerobe Lebensweise angepaßt haben, verfügen auch über einen aeroben Stoffwechsel oder stammen von Vorfahren mit einem wahrscheinlich aeroben Stoffwechsel ab (Livingstone 1983). Diese Arten haben verschiedene Wege entwickelt, die zum Leben notwendige Energie auch dann zu gewinnen, wenn kein aerober Stoffwechsel möglich ist. Welche speziellen Vorgänge für einen anaerobe Energiegewinnung genutzt werden, zeigt am deutlichsten ein Vergleich mit den Vorgängen des aeroben Stoffwechsel.

1. Die aerobe und anaerobe Glykolyse

Steht Sauerstoff zur Verfügung, so kann ein Substrat im Krebs-Zyklus vollständig zu CO_2 und zu Reduktionsäquivalenten in Form von $NADH+H^+$ oder $FADH+H^+$ "zerlegt" werden. Die Wasserstoffatome des $NADH+H^+$ und $FADH+H^+$ werden über die Reaktionen der Atmungskette auf Sauerstoff übertragen und es entsteht H_2O. Je nach dem, ob die Wasserstoffatome vom $NADH+H^+$ oder $FADH+H^+$ angeliefert werden, kann die freiwerdende Energie dieser biologischen "Knallgas-Reaktion" an drei bzw. zwei Schritten der Atmungskette als energiereiche Phosphatbindung des ATP festgehalten werden und steht damit für alle biologischen Vorgänge zur Verfügung. Die Reaktionen des Krebs-Zyklus und der Atmungskette finden in den Mitochondrien statt.

Im Cytoplasma läuft hingegen der Abbau von Kohlenhydraten zum Pyruvat nach dem Embden-Meyerhof-Parnas-Schema, der klassischen Glykolyse, ab. Dabei werden, unter Verbrauch von einem ATP-Molekül, an den Hexosen zwei energiereiche Phosphatbindungen gebildet, die bei der Spaltung der Hexosen auf die Triosen übergehen und beim reduzierenden Schritt der Glycerinaldehyd-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) auf zwei pro Triose vermehrt werden. Diese Energie der Phosphatreste an den Triosen kann direkt durch die Schritte der Phosphoglyceratkinase und der Pyruvatkinase auf das ADP übertragen werden. Diese sog. "Substratkettenphosphorylierung" ist nicht von Sauerstoff abhängig und kann deshalb auch anaerob ablaufen. Unter anaeroben Bedingungen muß aber für die Reduktionsäquivalente des $NADH+H^+$, die in der GAPDH-Reaktion entstehen, ein anderer Akzeptor als Sauerstoff gefunden werden, um das für den Ablauf der Glykolyse benötigte NAD^+ zu regenerieren.

Eine solche spezifische Reaktion zum Ausgleich der Redoxbilanz unter anaeroben Bedingungen ist die Reduzierung von Pyruvat zu Lactat, die im Cytoplasma der Zelle stattfindet. Fast alle Lebewesen haben das Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) und damit die Möglichkeit, die Glykolyse durch Bildung von Lactat anaerob ablaufen zu lassen, wobei im Verlauf des Glykogenabbaus drei ATP pro Glykosyleinheit gewonnen werden können. Während bei allen Vertebraten und Arthropoden allein die LDH als terminale Dehydrogenase der Glykolyse dient, haben die meisten Mollusken, Anneliden und Sipunculiden andere Pyruvat reduzierende Enzyme neben oder an Stelle der LDH. Die Enzyme Octopin-, Alanopin- und Strombindehydrogenase katalysieren die Kondensation von Pyruvat mit den Aminosäuren Arginin, Alanin bzw. Glycin unter Verbrauch eines Reduktionsäquivalents, so daß NAD^+ regeneriert wird. Es entstehen dabei die

als "Opine" bezeichneten Endprodukte Octopin (N-((S)-1-carboxy-4-guanidinobutyl)-(R)-alanin), meso-Alanopin (N-(1-carboxyethyl)-alanin) bzw. D-Strombin (N-(carboxymethyl)-(R)-alanin).

2. Die Fumaratreduktase-Reaktion

Eine weitere Möglichkeit anaerober Energiegewinnung bietet das unterschiedliche Redoxpotential der Reduktionsäquivalente $NADH+H^+$ und $FADH+H^+$. Es können die H-Atome des $NADH+H^+$ über die ersten Schritte der Atmungskette auf FAD^+ übertragen werden, wobei ein ATP pro zwei H-Atome gewonnen wird. Sind die Voraussetzungen zur Regeneration von FAD^+ gegeben, z.B. durch die Fumaratreduktase-Reaktion, die dabei Fumarat zu Succinat reduziert, so kann diese Reaktion auch anaerob ablaufen. Das Fumarat wird aus Malat regeneriert, d.h. es entsteht Succinat in einer Sequenz, die gegenläufig zu einem Teil des Krebs-Zyklus ist (de Zoeten und Tipker 1969, Schroff und Schöttler 1977, Holwerda und de Zwaan 1979).

Da Malat nur in geringen Mengen in den Geweben gespeichert wird, sind folgende Wege zur Nachlieferung von Malat und damit Fumarat entwickelt worden:

Zum einen kann die NH_3-Gruppe der Aminosäure Aspartat auf 2-Oxoglutarat übertragen und das verbleibende Kohlenstoffgerüst Oxalacetat durch die Malatdehydrogenase (MDH) zu Malat reduziert werden, welches dann in die Mitochondrien gelangen kann.

Zum anderen kann durch die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat (PEP) Oxalacetat gebildet werden. Diese Reaktion wird durch die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) katalysiert. Die energiereiche Phosphatbindung des PEP bleibt hierbei durch Bildung von Inosintriphosphat (ITP) erhalten (s. de Zwaan et al. 1976). Auf diese Weise bietet sich die Möglichkeit, unter anaeroben Bedingungen Glykogen zu Succinat abzubauen und dabei mindestens 2.5 Mol ATP/Mol Succinat zu gewinnen. Die weitere Umsetzung des Oxalacetat zum Succinat erfolgt wie oben beschrieben. In beiden Fällen erfolgt eine Regeneration von NAD^+ bei der Reduktion des Oxalacetats zum Malat, d.h. die MDH übernimmt die Funktion der LDH.

Viele Invertebraten können in den Mitochondrien das anaerob gebildete Succinat weiter zu Propionat umsetzen und dabei die energiereiche Bindung der Vorstufe Propionyl-Coenzym A (CoA) in Form von ATP konservieren. Entsprechendes gilt auch für die CoA-Bindungen des Succinyl- und Acetyl-CoA, wenn Succinat bzw. Acetat daraus freigesetzt werden (Schroff und Zebe 1980, Schulz et al. 1981, Wienhausen 1981).

Speziell für Nervengewebe wird die Möglichkeit einer anaeroben endogenen

Oxidation diskutiert (Zs-Nagy 1977). Dabei fungieren die Doppelbindungen des gespeicherten gelben Lipochrompigments anstelle des Sauerstoffs als Elektronen-Akzeptoren.

3. Die Phosphagene

In Zeiten guter Sauerstoff- und Energieversorgung werden in den Geweben energiereiche Phosphatbindungen in Form von Phosphaten bestimmter Guanidin-Verbindungen, den sog. Phosphagenen, gespeichert. Bei Vertebraten ist Kreatinphosphat das Phosphagen, bei Invertebraten übernimmt neben anderen Verbindungen sehr häufig Argininphosphat diese Rolle.
Da die Aktivitäten der Enzyme, die diese "Verschiebung" der Phosphatbindung katalysieren (z.B. ATP + Arginin <===> ADP + Argininphosphat), in den phosphagenhaltigen Geweben sehr hoch sind, befinden sich die Phosphagene mit dem ATP-Gehalt der Zellen im Gleichgewicht und "puffern" die ATP-Konzentration. Energie wird als Phosphagen und nicht als ATP gespeichert, weil die Adenosinphosphate schon durch geringe Konzentrationsveränderungen viele katabolische und anabolische Stoffwechselvorgänge beeinflussen.
Neben der Pufferung des ATP-Gehalts haben die Phosphagene wahrscheinlich die Aufgabe, zwischen dem Ort der ATP-Bildung, den Mitochondrien, und dem Ort des Energieverbrauchs zu vermitteln, denn Muskelgewebe enthalten immer hohe Phosphagenkonzentrationen, egal ob sie anaerob arbeiten oder keinerlei anaerobe Arbeitsweise unter physiologischen Bedingungen festgestellt werden kann (siehe Hochachka 1985).

III. Wege des anaeroben Energiestoffwechsels

Die oben angesprochenen Möglichkeiten anaerober Energiegewinung können in unterschiedlichem Ausmaß und verschiedenen Kombinationen in Vertretern aller Tierstämme beobachtet werden.
In Vertebraten z.B. erfolgt die anaerobe Energiegewinnung durch die Umsetzung von Glykogen zu Lactat, welche durch den Abbau von Kreatinphosphat ergänzt wird. Es gibt auch hier die Möglichkeit anaerober Bildung von Succinat aus Aspartat, doch sind die Kapazitäten dieser Reaktionsfolge sehr gering (Taegtmeyer 1978, Gäde und Ellington 1983).
Ebenso wie bei den Vertebraten basiert der anaerobe Stoffwechsel bei Arten "niederer" Stämme auf dem Abbau von Phosphagen und Glykogen. Häufig dient zusätzlich die Aminosäure Aspartat als Substrat.

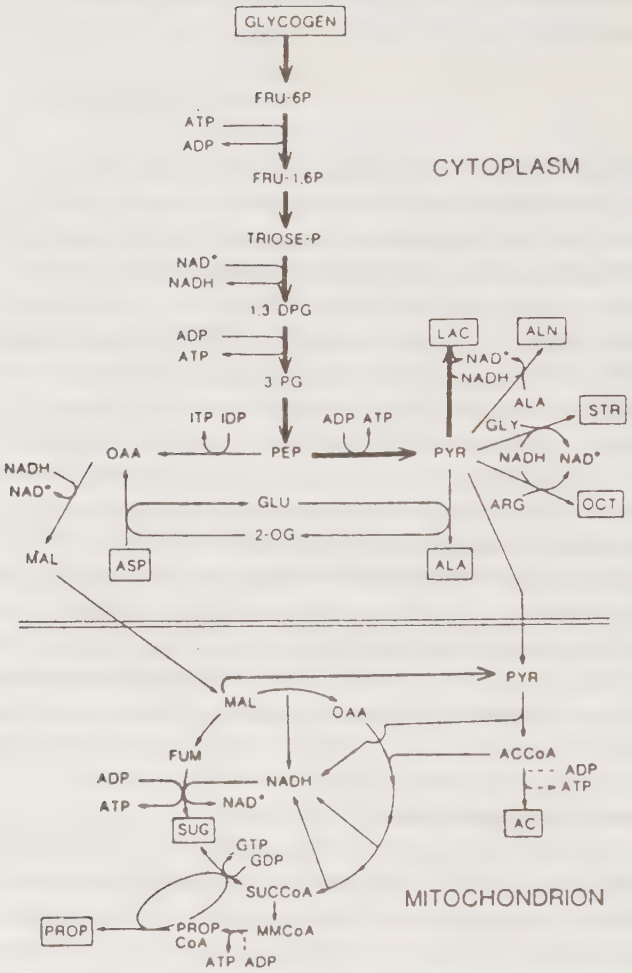

Abb. 1: Schema der Wege des anaeroben Kohlenhydratstoffwechsels am Beispiel der Miesmuschel Mytilus edulis (de Zwaan und Dando 1984). Die dicken Pfeile markieren den Verlauf der klassischen Lactatgärung nach dem Embden-Meyerhof-Parnas-Schema.

Im Gegensatz zu den Verhältnissen in Vertebraten werden jedoch bei bestimmten niederen Tieren (Mollusken, Anneliden, Sipunculiden etc.) viele verschiedene Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels nebeneinander vorgefunden: Acetat, Propionat, Succinat, D- und L-Lactat, D- und L-Alanin, Glutamat, Octopin, Strombin, Alanopin, Malat und CO_2 (siehe de Zwaan 1977, Livingstone 1983). Der Anteil der einzelnen Metabolite an der Gesamtheit aller Endprodukte ist unterschiedlich für jede Art, einzelne Gewebe, die Dauer der Anaerobiose und die äußeren Bedingungen (Temperatur!).

1. Das Schema des anaeroben Stoffwechsels bei Invertebraten

Die Unterschiede zwischen dem anaeroben Stoffwechsel der Invertebraten und der "klassischen Lactatgärung" der Vertebraten sind eingehend an Tieren der Gezeitenzone untersucht worden, und zwar besonders an Muscheln mit fakultativ anaeroben Lebensbedingungen und entsprechend euryoxischer Lebensweise.
Dazu wurden zum einen die Aktivitäten von Enzymen des anaeroben Stoffwechsels und deren kinetische Eigenschaften bestimmt, zum anderen die Mengen der verschiedenen Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels nach unterschiedlicher Dauer und verschiedenen Bedingungen der Anaerobiose gemessen. Durch den Einsatz markierter Verbindungen und spezifischer Inhibitoren konnten die Stoffwechselwege sichtbar gemacht werden.
Die daraus gewonnen Erkenntnisse über den anaeroben Stoffwechsel sind im Schema in Abb. 1, das für die Miesmuschel Mytilus edulis erstellt wurde, zusammengefaßt.
Das gezeigte Schema stimmt in wesentlichen Teilen auch mit dem Stoffwechsel anderer euryoxischer Invertebraten überein (Schöttler 1982, Livingstone 1983). Dies gilt insbesondere für folgende Punkte:

1. Der Krebs-Zyklus und die Atmungskette sind vollständig vorhanden (Gabbot 1976).
2. Die Glykolyse läuft nach dem sog. Embden-Meyerhof-Parnas-Schema ab.
3. Die Fumaratreduktase-Reaktion katalysiert die Übertragung von zwei H-Atomen des $NADH+H^+$ über Stufen der Atmungskette auf Fumarat unter Bildung von Succinat und ATP.
4. Eine oder mehrere Pyruvatreduktasen fungieren als terminale Dehydrogenasen der anaeroben Glykolyse.
5. Die Glykolyse kann auf der Stufe der PEP durch die carboxylierende Reaktion der PEPCK zum Oxalacetat verzweigt werden, von wo aus der Stoffwechselweg über die Fumaratreduktase-Reaktion zum Succinat führt.

6. Malat kann in den Mitochondrien durch die decarboxylierende Malatdehydrogenase ("malic enzyme") in Pyruvat und CO_2 gespalten werden.
7. Die Bildung von Alanin erfolgt durch die Glutamat-Pyruvat-Transaminase. Glutamat wird durch die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase aus Aspartat regeneriert. Eine weitere Möglichkeit Glutamat zu bilden, nämlich mittels der Glutamatdehydrogenase aus 2-Oxoglutarat und NH_3, ist in Limulus polyphemus mit großer Wahrscheinlichkeit nachgewiesen worden (Carlsson 1984).

2. Spezielle Probleme des anaeroben Energiestoffwechsels

Die Vielfalt der Stoffwechselwege spiegelt die verschiedenen Arten der Anpassung an die mannigfaltigen Probleme wider, die der Energiestoffwechsel eines Lebewesens unter anaeroben Bedingungen zu bewältigen hat.
Einmal beträgt die Energieausbeute als ATP aus einer bestimmten Menge Substrat unter anaeroben Bedingungen nur 8 - 20% der Ausbeute bei aerobem Abbau. Zur Deckung eines gleichbleibenden Energiebedarfs muß demnach unter anaeroben Bedingungen die 5- bis 12fache Menge des aerob benötigten Substrats umgesetzt werden (Pasteur-Effekt).
Während der Anaerobiose ist oft auch die Nahrungsaufnahme unterbrochen, z.B. bei Lebewesen der Gezeitenzone. Daher müssen die Substrate des anaeroben Energiestoffwechsels wie Glykogen, Aspartat und Argininphosphat in den Geweben gespeichert werden. Glykogen eignet sich besonders zur Speicherung in großen Mengen. In Muscheln z.B. bestehen bis zu 20% des Trockengewichts aus Glykogen.
Weiterhin ist für den anaeroben Ablauf der Glykolyse ein Ausgleich der Redoxbilanz $NAD^+/NADH+H^+$ nötig. Da Sauerstoff als Akzeptor der Reduktionsäquivalente nicht zur Verfügung steht, müssen spezielle Reaktionen die Regeneration des NAD^+ übernehmen (s.o.). Im Cytoplasma wird dies durch ein Pyruvat reduzierendes Enzym katalysiert, in den Mitochondrien können diese Aufgabe die MDH und die Fumaratreduktase übernehmen.
Im Verlauf der Anaerobiose werden außerdem Endprodukte gebildet, die einerseits oft Säuren sind, z.B. Propionat, Succinat, Acetat oder Lactat und andererseits nicht so einfach auszuscheiden sind wie CO_2 und H_2O, die Endprodukte der vollständigen Oxidation. Falls die anfallenden Endprodukte nicht aus dem Geweben entfernt werden können, hat dies zur Folge, daß diese durch ihre Anhäufung hemmend auf den Fortgang der entsprechenden Reaktion wirken und daß damit die Dauer der anaeroben Energiegewinnung begrenzt ist.

3. Spezifische Anforderungen biotopbedingter und funktioneller Anaerobiose

Wie eingangs bereits erwähnt, unterscheiden sich die funktionelle und die biotopbedingte Anaerobiose sehr wesentlich in ihren Anforderungen an den Energiestoffwechsel.

Bei der funktionellen Anaerobiose des kontrahierenden Muskels wird eine kurzzeitige erhöhte Energiebereitstellung durch den anaeroben Stoffwechsel verlangt. Eine Anpassung an diese Erfordernisse stellt die Lactatgärung im Vertebratenmuskel dar. Der Abbau des gespeicherten Phosphagens überbrückt die Zeit zwischen dem Beginn der Muskeltätigkeit und der erforderlichen Aktivierung der Glykolyse (Pasteur-Effekt). Der Ausgleich der Redoxbilanz erfolgt für die Glykolyse im Cytoplasma durch die stöchiometrische Kopplung der GAPDH-Reaktion an die der LDH. Bei anhaltender Lactatbildung wird das Lactat vom Muskel ans Blut abgegeben. Die Lactatkonzentration im Blut wird jedoch dadurch niedrig gehalten, daß ausreichend mit Sauerstoff versorgte Gewebe wie Herz, Lunge und Gehirn das Lactat aus dem Blut aufnehmen und als Substrat für die vollständige Oxidation verwenden.

Der entsprechende Energiestoffwechsel verläuft bei funktioneller Anaerobiose der stark kontrahierenden Muskeln von Invertebraten wie Loligo, Pecten, Arenicola und Sipunculus nach den gleichen Prinzipien inklusive Phosphagenabbau, erhöhter Glykolyse und cytoplasmatischem Redoxbilanzausgleich (Gäde 1980a, Livingstone 1982). Allerdings ist bei diesen Arten nicht Lactat das Endprodukt der anaeroben Glykolyse, sondern die sog. Opine, Produkte der reduzierenden Kondensation von Pyruvat mit einer Aminosäure. Die Produkte Alanopin, Strombin bzw. Octopin sind nur schwache Säuren, was möglicherweise ein Vorteil für den Organismus darstellt (Fields 1983). Die Kondensation von Pyruvat mit Arginin zu Octopin koppelt zudem die Glykolyse mit dem Abbau des Phosphagens Argininphosphat. Da das Lactat eine geringere Molekülgröße besitzt als die verschiedenen Opine, werden diese anscheinend schwerer aus den Geweben ausgeschieden. Nur bei Tintenfischen wurde bisher die Abgabe von Octopin aus den Muskeln in die Hämolymphe beobachtet (Storey und Storey 1980, Gäde 1980b).

Erfordert die funktionelle Anaerobiose des arbeitenden Muskels eine Maximierung der Energiebereitstellung innerhalb kurzer Zeit, so muß bei biotopbedingter Anaerobiose die Energiegewinnung aus den vorhandenen Vorräten optimiert werden, um auch langanhaltende Perioden des Sauerstoffmangels überdauern zu können.

In der Übergangsphase von aeroben zu anaeroben Bedingungen ähnelt der Stoffwechsel bei biotopbedingter Anaerobiose dem bei funktioneller Anaerobiose. Der Energiebedarf wird anfangs vorwiegend durch den Abbau der vorhandenen

Phosphagenreserven gedeckt (siehe z.B. Gäde 1983). Der Ausgleich der Redoxbilanz erfolgt im Cytoplasma durch die Bildung von Lactat, Opinen und/oder Alanin. Auffällig ist der Abbau vorhandener Aspartatvorrate in den ersten Stunden der biotopbedingten Anaerobiose. Die Aminogruppe des Aspartats geht via Glutamat in das gebildete Alanin ein, das verbleibende Kohlenstoffgerüst Oxalacetat wird zu Malat reduziert und anschließend in Succinat und eventuell weiter in Propionat umgesetzt (s.o.). Da die Aspartatvorräte begrenzt sind, erfolgt mit Fortdauer der Anaerobiose auf der Stufe der PEP-Umsetzung eine Umleitung der Glykolyse von der Pyruvatbildung hin zur Oxalacetatbildung. Damit ist die Umsetzung der großen Glykogenvorräte in die Endprodukte Succinat und Propionat möglich. Die Bildung von Succinat und Propionat hat zwei verschiedene Vorteile. Zum einen ergibt sich dabei die effektivste Energieausbeute aus dem vorhandenen Substrat, die unter anaeroben Bedingungen möglich ist, zum anderen sind Succinat und besonders Propionat flüchtige Fettsäuren, die leicht aus den Geweben ausgeschieden werden können. Dies wiederum ist eine notwendige Voraussetzung für den langanhaltenden Ablauf einer anaeroben Energiegewinnung, deren Dauer dann theoretisch nur noch durch die Größe der Glykogenvorräte begrenzt ist. In der Tat finden sich bei allen Tieren, die Anaerobiose tage- und wochenlang ertragen können, Succinat und Propionat sowie Acetat als bedeutendste Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels (de Zwaan 1977).

Im Verlauf biotopbedingter Anaerobiose ist generell eine Reduzierung der Energieverbrauchsrate zu beobachten, die ihren Minimalwert erreicht, wenn die Energie nur noch aus der Succinat/Propionat-Bildung gewonnen wird. Dieser Minimalwert beträgt lediglich etwa 5% der aeroben Verbrauchsrate (siehe de Zwaan und Wijsman 1976, Gäde 1983). Ob sie durch die geringe Kapazität der mitochondrialen Succinat/Propionat-Bildung vorgegeben ist, oder ob der reduzierte Energieverbrauch bei biotopbedingter Anaerobiose eine generelle Maßnahme des Organismus zur Einsparung von Substrat ist, bleibt bislang ungeklärt. Ebenso ist noch nicht bekannt, welche energieverbrauchenden Prozesse (Ionenregulation, Anabolismus etc.) für lange Zeit eingeschränkt oder abgestellt werden können, ohne daß der Organismus irreparable Schäden erleidet.

IV. Die Regulation des anaeroben Stoffwechsels

Der Reduzierung des Energieverbrauchs bei biotopbedingter Anaerobiose auf etwa 5% des Wertes unter aeroben Bedingungen steht eine auf 8% bis 17% verminderte Energieausbeute durch anaerobe Prozesse bei unverändertem Substratumsatz gegenüber. Der Glykolyseumsatz bleibt hier zumindest gleich oder wird sogar reduziert. Im Gegensatz dazu ist bei funktioneller Anaerobiose die Glykolyserate stark erhöht, bei der schwimmenden Kammmuschel Placopecten magellanicus z.B. auf etwa das 70-fache des Basalwertes (de Zwaan et al. 1980). Für arbeitende Vertebratenmuskeln wurde sogar ein maximaler Aktivierungsfaktor von 2000 errechnet (Hochachka 1985).
Die Glykolyserate wird also entsprechend der anaeroben Situation reguliert, d.h. aktiviert bei funktioneller und gleichgehalten oder gehemmt bei biotopbedingter Anaerobiose. Bei langanhaltender Anaerobiose muß zudem der glykolytische Stoffwechselweg so verändert werden, daß nicht mehr allein die Umsetzung von PEP zu Pyruvat erfolgt, sondern aus PEP auch Oxalacetat gebildet wird und damit Succinat aus Glykogen entstehen kann.
Die Enzyme Glykogenphosphorylase, Phosphofructokinase (PFK) und Pyruvatkinase (PK) katalysieren Schritte der Glykolyse, die unter physiologischen Bedingungen nicht direkt reversibel sind und deren Gleichgewichtslagen ("mass action ratio", MAR) in vivo weit von den zugehörigen Reaktionsgleichgewichten (K_{eq}) entfernt sind. Außerdem sind ihre Aktivitäten, verglichen mit denen anderer glykolytischer Enzyme, relativ gering, wodurch sich Beeinflussungen ihrer Aktivitäten stark auf den Gesamtumsatz der Glykolyse auswirken (Rollestone 1972).

1. Die Glykogenphosphorylase

Die Glykogenphosphorylase wurde bei Invertebraten nur für wenige Muschelarten untersucht, weit mehr Ergebnisse liegen jedoch für Insekten und Crsustaceen vor (siehe de Zwaan 1983, Goldsworthy und Gäde 1983, Sedlmeyer 1984). Die Befunde lassen es aber als sehr wahrscheinlich erscheinen, daß die Eigenschaften und die Aktivierungssysteme der Invertebratenphosphorylasen denen der Säugetiere sehr ähnlich sind, über die sehr genaue Untersuchungen vorliegen (Cohen 1982, 1983, Fischer 1983). Zwei Arten von Signalen, endokrine und neuronale, bewirken, wenn auch indirekt, die Aktivierung der Glykogenphosphorylierung. Verschiedene endokrine Substanzen veranlassen auf dem Wege der Aktivierung von membrangebundenen Adenylatcyclasen das kaskadenartige System der Phosphorylase-Aktivierung. Vereinfacht dargestellt, besteht das

Aktivierungssystem aus einer cyclo-AMP-abhängigen Proteinkinase, die durch ATP-abhängige Phosphorylierung eine inaktive Phosphorylasekinase "b" in eine aktive Phosphorylasekinase "a" umwandelt. Die aktive Kinase phosphoryliert als nächsten Schritt der Kaskade ihrerseits inaktive, AMP-abhängige Glykogenphosphorylase (b-Form), so daß daraus die aktive, AMP-unabhängige a-Form entstehen kann. Der neuronale Mechanismus der Phosphorylaseaktivierung besteht aus Membrandepolarisierung und Ca^{2+}-Freisetzung aus dem Sarcoplasmatischen Reticulum. Ca^{2+} und die Ca-bindenden Proteine Calmodulin bzw. Troponin C bewirken eine Aktivierung der Phosphorylasekinase "b", die dann die Phosphorylase "b" in die a-Form umwandelt.
Die Kaskade der Phosphorylase-Aktivierung hat zwei Funktionen: zum einen verstärkt sie Signale, so daß die enorme Steigerung der Glykolyse bei funktioneller Anaerobiose möglich wird, zum anderen erlaubt der "aktiv - inaktiv" Kontrollmechanismus der Phosphorylase, daß sie bei biotopbedingter Anaerobiose als "Flux-Generator" am Anfang der Glykolyse steht, obwohl die Glykogenreserven so groß sind, daß sie zur Sättigung der Phosphorylase "a" reichen würden (Hochachka et al. 1983).

2. Die Phosphofructokinase

Der nächste obligatorische Regulationspunkt der Glykolyse, die Bildung von Fructose-1,6-bisphosphat (FBP), wird von der PFK katalysiert. Typischerweise ist die Substratsättigungskurve der PFK für Fructose-6-phosphat (F-6-P) sigmoid, die für ATP hyperbolisch. Effektivster Modulator der PFK-Aktivität, dessen Konzentration sich aber nur langsam ändert, ist Fructose-2,6-phosphat (F-2,6-P) (Hers 1984). In mikromolaren Konzentrationen bewirkt es die Erhöhung der Affinität für F-6-P und hebt die Substrathemmung des ATP auf. Einen ähnlichen Effekt hat AMP. ADP, inorganisches Phosphat und das Ammoniumion wirken nur in hohen Konzentrationen als Aktivatoren. Inhibitoren sind neben ATP die Metabolite Argininphosphat, PEP, Glycerat-3-phosphat, Protonen (niedriger pH-Wert) und insbesondere bei Vertebraten Citrat (Storey 1976, 1984, Ebberink 1982). Die Aktivierung der FBP-Bildung durch F-2,6-P und AMP wird noch dadurch verstärkt, daß diese beiden Metabolite inhibierend auf die Fructosebisphosphatase wirken, die FBP wieder zu F-6-P hydrolysiert (Hers 1984). Die Eigenschaften der PFK deuten an, daß ihre Regulation nicht für die Reduktion der Glykolyse bei biotopbedingter Anaerobiose sorgt (Ebberink und de Zwaan 1980), sondern auf die Erhöhung der Glykolyserate bei funktioneller Anaerobiose ausgerichtet ist (Grieshaber 1982, Hochachka et al. 1983): Bei Muskelaktivität wird rasch ATP

verbraucht, welches durch den Abbau der Phosphagene nur zum Teil wieder aufgefüllt wird. Die Verminderung der ATP- und Argininphosphatgehalte in den Geweben sowie die Bildung von AMP bauen die Hemmung der PFK ab, wobei das AMP zusätzlich die Affinität des Enzyms für F-6-P erhöht.

3. Die Pyruvatkinase und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase

Ein weiterer potentieller Regulationspunkt im Ablauf der Glykolyse ist die durch die PK katalysierte Umsetzung von PEP und ADP zu Pyruvat und ATP.
Auffälligerweise ist in vielen Muscheln die PK für das Substrat PEP allosterisch reguliert (de Zwaan 1983). FBP aktiviert das Enzym und kann auch dessen Hemmung durch Alanin aufheben. Hohe Protonen-, ATP- und Alaninkonzentrationen verringern jedoch die Umsatzrate der PK. Während die PK der Muscheln mehr dem L-Typ in der Vertebratenleber gleicht, ist die PK in Cephalopoden ein nicht reguliertes Enzym (Storey und Hochachka 1975), das eher dem M-Typ der Vertebratenmuskulatur entspricht.
Mit der PK konkurriert das Enzym PEPCK um das Substrat PEP.

$$PEP + CO_2 + IDP \Longleftrightarrow Oxalacetat + ITP.$$

In Muscheln wird die PEPCK einerseits durch eine ITP-Hemmung und andererseits durch eine Aktivierung bei niedrigen pH-Werten reguliert (de Zwaan 1977). Die metabolische Regulation am PEP-Verzweigungspunkt stellt man sich folgendermaßen vor (Gabbot 1976, de Zwaan 1977): Unter aeroben Bedingungen kann die PK PEP zu Pyruvat umsetzen, da die PEPCK durch den leicht alkalischen pH-Wert und die hohe ITP-Konzentration gehemmt ist. Unter anaeroben Bedingungen dagegen ist die PK durch das in der Anfangsphase der Anaerobiose gebildete Alanin und ein Absinken des pH-Wertes gehemmt. Letzterer Umstand wiederum aktiviert die PEPCK. Wichtiger als die metabolische Inhibition der PK ist vielleicht die kovalente Modifikation des Enzyms während der Anaerobiose (de Zwaan und Dando 1984), die erst in den letzten fünf Jahren entdeckt und untersucht worden ist. Eine cyclo-AMP-abhängige Phosphorylierung der PK verändert die kinetischen Eigenschaften dahingehend, daß die Affinität des Enzyms für das Substrat PEP und den Aktivator FBP geringer wird (Siebenaller 1979, Holwerda *et al.* 1983, Trausch und Bauchau 1984, Plaxton und Storey 1984, Hakim *et al.* 1985).

4. Der "energy charge"

Die Regulierung der Aktivitäten der PFK, PK und PEPCK durch Veränderungen der Konzentrationen von ATP bzw. ITP, ADP und AMP in den Geweben ist ein Beispiel für

das regulatorische Prinzip der Energieladung. Die Energieladung wird mit dem Wert des "energy charge" beschrieben:

$$\text{"e.c."} = \frac{\text{ATP} + 1/2\ \text{ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}} .$$

Da die Myokinase die Reaktion 2 ADP <===> ATP + AMP katalysiert, gibt der "energy charge" den Anteil der Adenylate am gesamten Adenylat-Pool an, der für den Organismus nutzbare Phosphatbindungen trägt. Der Wert ist 1, wenn alle Adenylate als ATP, und 0, wenn alle als AMP vorliegen. Schon eine geringe Erhöhung der AMP-Konzentration läßt den Wert des "energy charge" stark absinken.

V. Die Bedeutung der Pyruvatreduktasen

Wie bereits beschrieben, ist es ein einheitliches Merkmal des Stoffwechsels bei funktioneller Anaerobiose, daß der Ausgleich der Redoxbilanz durch die Pyruvatreduktasen im Cytoplasma erfolgt. Bei den Vertebraten ist das spezifische Enzym für diese Funktion LDH, aber bei vielen Mollusken und anderen Invertebraten sind es Octopindehydrogenase (ODH), Alanopindehydrogenase (AlDH) oder Strombindehydrogenase (StDH) (siehe Übersichtsartikel von de Zwaan und Dando 1984, Gäde und Grieshaber 1986). Das Vorkommen der einzelnen Opindehydrogenasen in verschiedenen Tierarten wird mit den jeweiligen Konzentrationen der freien Aminosäuren in Zusammenhang gebracht. Besonders in marinen Invertebraten können diese Konzentrationen sehr hoch sein (Simpson et al. 1959).
Der nun folgende Vergleich der Eigenschaften und Funktionen der LDH mit denen der Opindehydrogenasen soll zeigen, in welchem Maß die Opindehydrogenasen bei den Mollusken und anderen Invertebraten die Rolle der LDH übernehmen, oder eine eigenständige Entwicklung neben der LDH sind.

1. Die Lactatdehydrogenase

Ein aktives LDH-Molekül setzt sich aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa zusammen. Die LDH der Vertebraten, Insekten und Crustaceen, die ausschließlich L-Lactat bildet, ist nur als Tetramer aktiv. Die D-Lactat bildende LDH bei verschiedenen Invertebraten ist mit einer Ausnahme (Balanus nubilus, Ellington und Long 1978) immer ein Dimer. Die phylogenetische Zuordung von L- und

D-LDH ist nicht so eindeutig, wie zunächst angenommen wurde (Long und Kaplan 1968), denn bei den Anneliden und Mollusken gibt es sowohl Arten mit D- als auch solche mit L-spezifischer LDH.
Der Substratumsatz der LDH ist immer eine Reaktion erster Ordnung und gilt als Beispiel für eine auch in vivo im Gleichgewicht befindliche Reaktion.
Effektoren sind nicht bekannt, und eine Produktinhibition setzt erst bei sehr hohen Laktatkonzentrationen ein.

2. Die "Opindehydrogenasen"

ODH, AlDH und StDH sind die kleinsten bekannten Dehydrogenasen. Sie sind Monomere mit einem Molekuargewicht von ca. 40 kDa. Während die ODH sehr spezifisch für Arginin und Pyruvat ist, setzt die AlDH zwar bevorzugt Alanin mit Pyruvat um, kann aber auch andere Aminosäuren oder 2-Oxosäuren metabolisieren. Noch breiter ist die Spezifität der StDH, die fast gleichwertig Glycin und Alanin mit Pyruvat oder Oxalacetat umsetzt (ausführlicher Überblick bei Gäde und Grieshaber 1986).
Die Opinbildung ist eine Reaktion mit drei Substraten

$$\text{Aminosäure} + \text{2-Oxosäure} + \text{NADH+H}^{+} \quad \langle === \rangle \quad \text{Opin} + \text{NAD}^{+} + \text{H}_2\text{O}.$$

Die Affinität zu jedem einzelnen Reaktionspartner ist um so größer, je höher die Konzentrationen der beiden anderen Substrate sind.
Die ODH zeigt allgemein eine deutliche Produkthemmung durch NAD^{+} und besonders durch Octopin. Gleiches gilt entsprechend für die AlDH und ihre Endprodukte NAD^{+} und Alanopin. Inhibitoren der Opindehydrogenasen sind die Adenylate und speziell für AlDH und StDH auch Succinat, ein Endprodukt des anaeroben Metabolismus.

3. Isoenzyme

Genetische Varianten der Pyruvatreduktasen sind in fast allen untersuchten Tierarten gefunden worden, aber meist sind sie ohne physiologische Bedeutung. Die muskelspezifische LDH der Vertebraten begünstigt jedoch durch ihre kinetischen Eigenschaften eine Lactatbildung. Das Isoenzym aus Leber, Herz oder Gehirn vermag dagegen eine schnelle Oxidation des Lactats zu katalysieren. Dies entspricht seiner Aufgabe, den aeroben Geweben das Lactat aus der funktionellen Anaerobiose der Muskeln als Substrat für die Gluconeogenese (Cori-Zyklus) oder den aeroben Stoffwechsel zur Verfügung zu stellen (Evers und Kaplan 1973; s.o.). Gewebsspezifische Isoenzyme, wie sie für die L-LDH der Vertebraten obligatorisch sind, gibt es für die Opindehydrogenasen nur in einzelnen Tierarten. Eine

entsprechende Aufgabenverteilung wird den gewebsspezifischen Isoenzymen der D-LDH aus Muskel und Hepatopancreas von Limulus polyphemus (Carlsson und Gäde 1985), den Isoenzymen der ODH in Muskel und Nervengewebe von Cephalopoden (Storey und Storey 1979, Gäde 1980b) sowie den Isoenzymen der AlDH aus Muskel und Hepatopancreas der Schnecke Busycotypys canaliculatum (Plaxton und Storey 1983) zugeschrieben. Voraussetzung für eine solche gewebsspezifische Aufgabenverteilung ist jedoch ein gut entwickeltes Zirkulationssystem, was zwar bei den aufgezählten Arten vorhanden ist, aber vielen anderen Invertebraten fehlt.

4. Die Rolle der Produkte der Pyruvatreduktasen

Für den Stoffwechsel bei biotopbedingter Anaerobiose gibt es kein einheitliches Konzept (s.o.). So häufen z.B. Vertebraten, Crustaceen, und verschiedenen Süßwasser- und Landschnecken Lactat in ihren Geweben an, weil ihnen nur die Lactatbildung als anaerober Stoffwechselweg zur Verfügung steht. In Muscheln und anderen Invertebraten jedoch, die einmal in den Muskelgeweben ODH neben geringen oder gar gänzlich fehlenden Aktivitäten der LDH vorweisen und zudem einen komplexen anaeroben Stoffwechsel entwickelt haben, wurden weder Lactat noch Octopin in bedeutenden Mengen als Endprodukte des Stoffwechsels bei biotopbedingter Anaerobiose vorgefunden. Man ging daher davon aus (Zandee et al. 1980), daß für diese Arten die Produkte der Pyruvatreduktasen nur bei funktioneller Anaerobiose und damit erhöhtem Energiebedarf eine Rolle spielten. Weiter glaubte man, daß das Pyruvat der Glykolyse in der Anfangsphase der biotopbedingten Anaerobiose zu Alanin umgesetzt würde und damit am "PEP-Verzweigungspunkt" die Umschaltung auf die Succinatbildung aus Glykogen erfolgte (s.o.).

Untersuchungen des anaeroben Stoffwechsels weiterer Tierarten und einzelner Gewebe führten allerdings zu der Ansicht, daß das aufgestellte Konzept zwar für Nichtmuskelgewebe gültig ist, aber für die Muskelgewebe vieler Arten revidiert werden muß.

Collicutt und Hochachka (1977) zeigten, daß im Herz der Auster die gesamte Succinatbildung aus dem Aspartatabbau erfolgt. Weitere Untersuchungen ergaben, daß dies auch für Muskelgewebe anderer Muscheln gilt (Ebberink et al. 1979, Meinardus und Gäde 1981, de Zwaan et al. 1983, Foreman und Ellington 1983). Theoretisch ist dabei eine Beteiligung des "malic enzyme" zu fordern, so daß auch Alanin aus dem Kohlenstoffgerüst des Aspartat entsteht (siehe Abb. 1). In diesem Falle könnten zwei Moleküle Aspartat und ein glykolytisches Pyruvat zu einem

Succinat, zwei Alanin und CO_2 bei Ausgleich der Redoxbilanz umgesetzt werden (de Zwaan 1983). Jedoch ist der stöchiometrische Zusammenhang zwischen den Mengen des abgebauten Aspartats und den Mengen des gebildeten Alanins und Succinats nicht in allen untersuchten Arten eindeutig nachgewiesen worden.
Gleichzeitig wurde die Existenz der Alanopin und Strombin bildenden Enzyme entdeckt (Fields, 1976), die bei marinen Invertebraten weit verbreitet sind und hauptsächlich in Muskelgeweben vorkommen (Livingstone et al. 1983). Die Messung der Mengen von Alanopin und Strombin in verschieden Geweben ergab, daß bei Arten wie z.B. der Miesmuschel, bei der weder nennenswerte Mengen an Lactat noch an Octopin gefunden worden waren, Strombin und/oder Alanopin in der Übergangsphase von aeroben zu anaeroben Bedingungen gebildet werden (Zurburg et al. 1982, de Zwaan und Dando 1984).
Beim Vergleich verschiedener Muscheln der Gezeitenzone war die Herzmuschel Cardium edule insbesondere dadurch aufgefallen, daß sie in den Muskelgeweben bemerkenswerte Aktivitäten von LDH neben denen der ODH aufweist (Gäde und Zebe 1973). Dazu kommen sehr hohe Aktivitäten der PK bei besonders niedrigen der PEPCK. Während biotopbedingter Anaerobiose häuft diese Muschelart als Stoffwechselendprodukt bedeutende Mengen von Lactat, aber kein Octopin an (Gäde 1975, Meinardus und Gäde 1981). Gleiches gilt für den Fußmuskel der verwandten Art Cardium tuberculatum, die aus dem Mittelmeer stammt (Gäde 1980c). Diese Muschelart hat zudem die ungewöhnliche Eigenart, bei Berührung durch einen Feind, wie z.B. einen Seestern, springende Fluchtbewegungen auszuführen, wobei sie sich mit ihrem kräftigen Fuß vom Untergrund abstößt. Ist die Muschel gezwungen, mehrere Male hintereinander zu springen, so wird im Fußmuskel Octopin, aber kein Lactat gebildet.
Hier scheint also der Fall vorzuliegen, daß die Glykolyse noch einmal auf der Stufe des Pyruvats verzweigt werden kann und die jeweilige Art der anaeroben Bedingung (biotopbedingte bzw. funktionelle Anaerobiose) darüber entscheidet, ob LDH oder ODH das Pyruvat umgesetzen. Da beide Enzyme Reaktionen katalysieren, die fast im Gleichgewicht gehalten werden und für diese Enzyme keine regulierenden Effektoren bekannt sind, erscheint die strikte Trennung von Lactat- und Octopinbildung paradox. Ein solcher situationsabhängiger Dualismus zweier Pyruvatreduktasen ist inzwischen jedoch auch für andere Arten beschrieben worden: In bestimmten Schnecken der Gattung Nassa (Baldwin et al. 1981, Gäde et al. 1984), der Messermuschel Ensis directus (Schiedek 1985) und dem marinen Wurm Sipunculus nudus (Pörtner et al. 1984) wird bei funktioneller Anaerobiose vorwiegend Octopin, bei biotopbedingter dagegen D-Lactat bzw. Strombin gebildet, der Pierwurm Arenicola marina produziert alternativ

Alanopin oder Strombin (Siegmund et al. 1985).

In der vorliegenden Untersuchung soll am Beispiel der springenden Herzmuschel Cardium tuberculatum geklärt werden,

1. welche Bedeutung die Produkte der einzelnen Pyruvatreduktasen für den gesamten anaeroben Energiestoffwechsel in verschiedenen physiologischen Situationen haben und
2. wie die Umsetzung des Pyruvats durch die verschiedenen Pyruvatreduktasen gesteuert wird.

B. Der Energiestoffwechsel der Herzmuschel C. tuberculatum während biotopbedingter Anaerobiose und seine Modifikation bei Einsatz spezifischer Stoffwechselinhibitoren

I. Der Einfluß bestimmter Faktoren auf den anaeroben Stoffwechsel

Die Herzmuschel C. tuberculatum lebt eingegraben im sandigen Untergrund dicht unter dessen Oberfläche. Im Gegensatz zu vielen Muscheln ähnlicher Lebensweise zeigt sie aber intensive Muskelaktivität bei ihren springenden Fluchtbewegungen. Sie besitzt auch die Fähigkeit, im Labor Perioden ohne Sauerstoff (Po_2 = 0 Torr) zu überleben. Diese Zeitspanne ist jedoch auf etwas über 20 Std. bei 22°C beschränkt. Das ist eine weit kürzere Anaerobiosedauer als sie z.B. die Herzmuschel der Gezeitenzone, C. edule, erträgt (72 Std. bei 16°C, Boyden 1972). Die Toleranz ist jedoch weit höher als bei sehr bewegungsaktiven Pecten-Arten (de Zwaan et al. 1980). Daher ist C. tuberculatum ein geeignetes Objekt, um die Auswirkungen von funktioneller und biotopbedingter Anaerobiose auf den Energiestoffwechsel an der gleichen Tierart zu untersuchen.

Zum Stoffwechsel von C. tuberculatum bei biotopbedingter Anaerobiose liegen für den Fußmuskel bereits Untersuchungen vor (Gäde 1980c), die aber in der vorliegenden Arbeit aus mehreren Gründen in detailierteren und umfassenderen Studien ausgedehnt wurden.

1. Der Fußmuskel repäsentiert nur ca. 20% des gesamten Weichkörpers der Muschel. Es sollte daher festgestellt werden, ob die Wichtigkeit der einzelner Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels im Muskelgewebe ihrer Bedeutung für die Energieproduktion des ganzen Organismus vergleichbar ist.
2. Den Messungen am Fuß der Muschel für zwei bestimmte Zeiten anaerober Inkubation, wurden detaillierte Ergebnisse zum zeitlichen Verlauf der Anhäufung der Endprodukte im Ganztier gegenübergestellt. In diesem Versuch wurde die anaerobe Inkubation so lange ausgedehnt, wie die Tiere diese in offensichtlich guter Verfassung überstehen konnten. Der Zeitverlauf gab Aufschluß über die zeitabhängigen Beiträge der einzelnen Endprodukte und damit der verschiedenen Stoffwechselwege zur gesamten anaeroben Energieproduktion.
3. Das Spektrum der bereits analysierten Metabolite des anaeroben Stoffwechsels wurde um Aspartat, die flüchtigen Fettsäuren Propionat und Acetat sowie die Opine Strombin und Alanopin erweitert, die in der vorherigen Untersuchung

nicht bestimmt worden waren.

4. Spezifische Inhibitoren der Glykolyse (Jodacetat), der Transaminierungsreaktionen (Aminooxyacetat) und der PEP-carboxylierenden Reaktion (3-Mercaptopicolinsäure) wurden im Verlauf sechsstündiger anaerober Inkubation eingesetzt. Die Veränderungen des Anteils der einzelnen Endprodukte an der Gesamtmenge aller Endprodukte, hervorgerufen durch die Inhibitoren, ließen Rückschlüsse auf die Stoffwechselwege zu, die die Entstehung der jeweiligen Endprodukte zur Folge haben. Besonderes Augenmerk galt der Frage, welche Endprodukte auf dem Wege der Glykolyse gebildet werden und welche nicht. Die Antwort wird zum einen benötigt, um die Höhe der Glykolyserate bei biotopbedingter Anaerobiose abschätzen zu können. Zudem ist sie erforderlich, um eine genaue Bilanz der anaeroben Energieproduktion für den gesamten Weichkörper von C. tuberculatum erstellen zu können.

II. Aufbau, Durchführung und Auswertung der Versuche

1. Versuchstiere

Die benötigten Exemplare der Herzmuschel C. tuberculatum wurden von Fischern der Stazione Zoologica di Napoli, Italien, aus sandigem Untergrund bei einer Wassertiefe von etwa 10 Metern herausgesammelt. In der Station wurden die Muscheln für wenigstens 24 h in Becken mit 250 l Seewasser gehältert, deren Boden mit ca. 10 cm Sand bedeckt war und die durch einen scharfen Wasserstrahl belüftet wurden. Für die Versuche wurden Muscheln mit einer Schalengröße von 3.6 $\pm$ 0.6 cm und einem Gewicht von 4.5 $\pm$ 1 g ausgewählt.

2. Enzyme, Cosubstrate und Chemikalien

Phospho-L-Arginin, 2-Oxoglutarat, (+)-Octopin, Jodacetat (JAc) und Aminooxyacetat (AOA, = Carboxymethoxylamin) wurden von der Fa. Sigma Chemie (Taufkirchen, B.R.D) bezogen, L- und D-Lactat von der Fa. Serva Feinbiochemikalien (Heidelberg, B.R.D.). Alle anderen beutzten Enzyme, Cosubstrate und Substrate sind von der Fa. Boehringer (Mannheim, B.R.D.) bezogen worden. Die übrigen Chemikalien waren Präparate von höchster Reinheit. Die 3-Mercaptopicolinsäure (MPA) wurde mir freundlicherweise von Dr. U. Schöttler, Universität Münster, überlassen.

Für analytische Zwecke wurde Octopindehydrogenase (E.C. 1.5.1.11) aus tiefgefrorenen Schließmuskeln von Pecten maximus nach der von Gäde und Carlsson (1984) beschriebenen Methode gereinigt. Zur Bestimmung von D-Lactat wurde D-Lactatdehydrogenase (1.2.1.28) aus gefrorenem Muskelgewebe von Limulus polyphemus verwendet. Das angewandte Reinigungsverfahren ist erst kürzlich von Carlsson und Gäde (1985) beschrieben worden.

3. Versuchsaufbau

Um die Bedingungen einer biotopbedingten Anaerobiose zu simulieren, bei der den Muscheln die Aufnahme von Sauerstoff für längere Zeit nicht möglich ist, wurde C. tuberculatum in Seewasser gehalten, das durch die Begasung mit Stickstoff (99.95%) sauerstofffrei gemacht worden war.

a) Verschiedene Perioden anaerober Inkubation

Dieser Versuch wurde im Oktober 1981 bei einer Wassertemperatur von 22°C durchgeführt. In zwei Waschflaschen mit 2 l stickstoffgesättigtem Seewasser wurden jeweils 10 Muscheln gesetzt. Das Seewasser wurde 1 Std. vor Beginn des Versuchs und während der Inkubation von Stickstoffgas durchströmt. Je fünf Muscheln wurden nach 2 bzw. 10 Std. Anaerobiose aus der einen Flasche und nach 6 bzw. 15 Std. aus der zweiten Flasche herausgenommen und für Metabolitbestimmungen aufgearbeitet. Die aerobe Vergleichsgruppe ("Kontrollen") waren fünf Muscheln, die zu Versuchsbeginn direkt aus dem Hälterungsbecken (22°C) entnommen wurden.

b) Anaerobe Inkubation nach Injektion von Stoffwechselinhibitoren

Der folgende Versuch wurde im September 1983 mit kleinen Muscheln (2.2 +/- 0.25 g) bei 22°C als Vorversuch durchgeführt und im Mai 1984 mit größeren Exemplaren bei 18°C in etwas erweitertem Umfang wiederholt. Der Temperaturunterschied zwischen den beiden Versuchsreihen entspricht der jahreszeitlichen Differenz der Wassertemperatur des Golfes von Neapel im Herbst und im Frühjahr.

Die Injektion einer Farblösung mittels einer kleinen Spritze mit dünner Kanüle in den Haemolymphsinus im unteren Teil des Muschelfußes ergab, daß man ca. 100 µl Lösung ohne sichtbaren Verlust an Flüssigkeit applizieren kann und sie sich

auf alle Teile des Weichkörpers gleichmäßig verteilt.
Die Inhibitoren wurden in einem Gemisch aus 25% 100 mM Imidazol-Puffer, pH 7.4, und 75% ultrafiltriertem Seewasser gelöst. Der pH-Wert der Lösungen wurde anschließend auf 7.5 - 8 eingestellt.
Noch vor Durchführung des Vorversuchs wurde in Rohextrakten von C. tuberculatum die Wirkung der Inhibitoren auf die verschiedenen Enzymsysteme überprüft. Die Testbedingungen sind in Material und Methoden des Teils E auf Seite 123 näher beschrieben. Die eingesetzten Inhibitoren sind spezifisch und bewirken nur bei einzelnen Enzymen die Hemmung der Aktivitäten. Der Inhibitor der Glykolyse (JAc) hemmt 50% der Aktivität der GAPDH bei einer Konzentration von 0.20 mM, AOA hemmt die Transaminasen GOT und GPT zu 50% bei Konzentrationen von 0.02 bzw. 0.13 mM und MPA hemmt die carboxylierende PEPCK entsprechend bei 0.01 mM zu 50%.
Die Muscheln für diese Versuche wurden jeweils nach möglichst gleicher Größe und gleichem Gewicht ausgewählt, um durch Injektion von 50 bzw. 100 µl Inhibitor-Lösung in etwa einheitliche Konzentrationen jeweils eines Inhibitors in allen Muscheln einer Versuchsgruppe zu erhalten. Wird das Gewicht des Weichkörpers von ca. 2 bzw. 5 g mit einer Dichte von 1 g/ml angenommen, so entstehen durch Injektion von 50 bzw. 100 µl einer 100 mM JAc-Lösung, einer 100 mM AOA-Lösung oder einer 50 mM MPA-Lösung in den kleinen Muscheln Konzentrationen von ca. 2.5 mM JAc oder AOA, in den großen Muscheln solche von ca. 2 mM JAc oder AOA und 1 mM MPA.

Jeweils drei oder vier Muscheln, die zuvor gewogen und gekennzeichnet worden waren, wurde die gleiche Menge der selben Inhibitor-Lösung injiziert. Sie wurden dann für sechs Stunden in 2 l stickstoffbegastem Seewasser inkubiert.
Einer Gruppe von jeweils vier Muscheln wurden 50 bzw. 100 µl des Imidazol/Seewassergemisches ohne Inhibitor injiziert, und drei Tiere wurden als aerobe, unbehandelte Kontrollgruppe direkt aus dem Hälterungsbecken entnommen (Mai 1984).

4. Entnahme und Lagerung der Gewebe

Nach Ablauf der anaeroben Inkubation wurden die Muscheln einzeln der Waschflasche entnommen. Sie wurden geöffnet, indem die Schließmuskeln mit einem Skalpell durchtrennt wurden. Der Weichkörper wurde von der Schale gelöst, gründlich auf Fließpapier abgetupft, um anhaftendes Wasser zu entfernen und

anschließend innerhalb von 30 Sek. in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die gefrorenen Weichkörper, einzeln in Aluminium-Folie verpackt, wurden in Trockeneis von Neapel nach Deutschland transportiert und dort bei -37°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

5. Bereitung der Perchlorsäure-Extrakte

Der gefrorene Weichkörper der Muschel wurde unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff in einem Metallmörser durch Hammerschläge zertrümmert und die Bruchstücke in einem ebenfalls stickstoffgekühlten Porzellanmörser mit einem Porzelanpistill zu feinem Pulver zermahlen.
Ein Teil des so erhaltenen Pulvers wurde für die Glykogenbestimmung bei -27°C eingefroren. Etwa 1 g des übrigen Pulvers wurde in ein vorgewogenes gläsernes 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit 2 ml eisgekühlter 6%iger Perchlorsäure gegeben. Das Röhrchen wurde mit dem Gewebspulver erneut gewogen, danach eiskalte Perchlorsäure bis zum Fünffachen des Frischgewichts (FG) des eingewogenen Gewebepulvers aufgefüllt und alles sofort bei Kühlung im Eisbad mit einem Ultra-Turrax Stab (N10, Fa. Janke und Kunkel) bei maximaler Geschwindigkeit in 15 Sekunden gut durchmischt.
Die denaturierten Proteine wurden bei 4°C in 20 Minuten bei ca. 40000xg abzentrifugiert. Das Volumen des sauren Überstandes wurde gemessen und mit etwa 10% des Extraktsvolumens an 5 M K_2CO_3 auf pH 6.5 gebracht. Das gebildete $KClO_4$ wurde abzentrifugiert (10 Min. bei 40000xg). Der neutralisierte Überstand wurde zur Bestimmung der verschiedenen Metabolite eingesetzt.
Die Analyse der Adenylate und des Argininphosphats erfolgte sofort, die Bestimmung weiterer Metabolite jedoch erst später aus Extrakten, die bei -27°C aufbewahrt worden waren.

6. Vorbereitungen zur Glykogenbestimmung

Es wurden 50 mg des Gewebepulvers mit 1 ml 30%iger KOH 25 Minuten in einem kochenden Wasserbad hydrolysiert. Die Polysaccharide wurden mit 2 ml 96%igem Alkohol ausgefällt und bei 40000xg abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in 2 ml Acetat-Puffer (0.2 M, pH 4.8) aufgenommen. Das in dieser Lösung enthaltene Glykogen wurde nach Hydrolyse mit Amylo-1.4-α-1.6-Glucosidase (Keppler und Decker 1974) als Glykosyleinheiten gemessen.

7. Metabolitbestimmungen

Die Konzentrationen der nachfolgend aufgeführten Metabolite wurden in den neutralisierten Perchlorsäure-Extrakten von C. tuberculatum mit enzymatischen Verfahren bei 1 ml Ansatzvolumen bestimmt. Der Verlauf der Extinktionsänderung bei 340 nm am Filter-Spektrophotometer während der Bestimmungen wurde mit einem angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet.

ATP und G6P nach Lamprecht und Trautschold (1974),
ADP und AMP nach Jaworeck, Gruber und Bergmeyer (1974),
Argininphosphat (Phospho-L-arginin) und
Arginin nach Gäde (1985a),
Octopin nach Gäde (1985b).

Im gleichen Ansatz wurden bestimmt:

D-Lactat nach Noll (1974) und
L-Lactat nach Gutmann und Wahlefeld (1974).
L-Alanin nach D.H. Williamson (1974),
D-Alanin nach Graßl (1974),
L-Aspartat nach Bergmeyer et al. (1974a),
Succinat nach J.R. Williamson (1974),
Glucose nach Bergmeyer et al. (1974b).

Der Variationskoeffizient der benutzten Methoden ist nur für die Alaninbestimmungen (5.4%) und die AMP-Bestimmung (13.5%) mit Werten größer als 5% angegeben (Bergmeyer et al. 1974).

Für die Bestimmung von

Strombin und Alanopin nach Siegmund und Grieshaber (1983) und
Propionat und Acetat nach Pörtner et al. (1984) wurde die Methode der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) benutzt.
Freundlicherweise haben die genannten Autoren mir ihre HPLC-Anlagen für die Bestimmungen zur Verfügung gestellt.

Die Konzentrationen der freien Aminosäuren in den Geweben von C. tuberculatum wurden auf dem automatischen Aminosäureanalysator des Typs Liquimat III (Fa. Kontron) bestimmt.
In den Perchlorsäure-Extrakten von Ganztieren wurden die Aminosäuren mit einem Programm für physiologische Flüssigkeiten (Siegmund und Grieshaber 1981) von B. Siegmund, Universität Düsseldorf, bestimmt.

Auf einem Gerät des gleichen Typs wurde von Dr. A. Palumbo, Stazione Zoologica di Napoli, das Spektrum der freien Aminosäuren im Fußgewebe von C. tuberculatum erstellt. Gepulvertes Fußgewebe von aeroben Kontrolltieren und solchen nach 15 Std. Anaerobiose wurde hierbei im Verhältnis 1/6.27 (w/v) im Puffer A (Li-Citrat, pH 2.85) des Analysesystems mit 3.75% Sulfosalycilsäure im Eisbad homogenisiert. Anschließend wurde der Extrakt für 5 Min. in einem kochenden Wasserbad erhitzt, um vorhandenes Argininphosphat zu hydrolysieren, da dieses mit dem Glutamat und Glutamin koeluiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation (1 h bei 30000 xg) für die Bestimmung eingesetzt.
Die Identifizierung und Berechnung der Aminosäurekonzentrationen erfolgte durch Vergleich mit der Analyse einer Standard-Lösung aus 20 verschiedenen Aminosäuren in definierter Menge.

8. Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Signifikanz von metabolischen Veränderungen während biotopbedingter Anaerobiose wurde durch eine Varianzanalyse geprüft. Alle Vergleiche von Mittelwerten wurden auf dem Niveau zweiseitiger 5%iger Ablehnungswahrscheinlichkeit gemacht.

III. Ergebnisse

Werden Exemplare von C. tuberculatum in sauerstofffreies Seewasser gesetzt, so öffnen sie schon nach wenigen Minuten die Schalen und breiten Mantelrand und Siphon aus. Mit einzelnen Fluchtbewegungen verändern die Muscheln innnerhalb der ersten zwei Stunden experimenteller Anaerobiose gelegentlich ihren Platz im Inkubationsgefäß. Alle eingesetzten Muscheln überlebten 15 Std. der anaeroben Inkubation in guter Verfassung und waren in der Lage, sich davon vollständig zu erholen (s. Teil D).

Das Glykogen ist ein wichtiges Substrat des anaeroben Stoffwechsels. Sein Gehalt wurde in vier Muscheln vom Oktober 1981 mit 229.5 $\pm$ 13.6 µMol Glykosyleinheiten/g FG bestimmt. Dies entspricht einem Gewichtsanteil von 3.74 % am Frischgewicht des Weichkörpers bzw. von 18.7 % am Trockengewicht (ca. 20% des FG).

Tabelle 1: Konzentrationen (µMol/g FG) verschiedener Metabolite des Energiestoffwechsels im gesamten Weichkörper nach verschiedenen Perioden experimenteller Anaerobiose bei 22°C. Angegeben ist der Mittelwert und eine Standardabweichung (in Klammern) aus den Messungen an 5 Muscheln.

A. Die Adenylate, deren Summe und der berechnete "energy charge" ("e.c.")

Dauer der Anaerobiose	ATP	ADP	AMP	Summe	"e.c."
aerobe Kontrolle	4.12 (0.60)	0.81 (0.03)	0.21 (0.12)	5.14 (0.56)	0.88 (0.03)
2 Std.	4.08 (0.39)	0.99* (0.06)	0.34 (0.04)	5.41 (0.44)	0.85 (0.01)
6 Std.	3.79 (0.23)	0.82 (0.06)	0.29 (0.15)	4.90 (0.38)	0.86 (0.02)
10 Std.	3.66 (0.55)	1.04* (0.13)	0.37 (0.14)	5.06 (0.61)	0.82* (0.04)
15 Std.	3.39* (0.37)	0.93* (0.11)	0.34 (0.07)	4.66 (0.37)	0.83* (0.02)

B. Argininhaltige Metabolite, deren Summe und der prozentuale Anteil des Phosphagens daran

Dauer der Anaerobiose	Arg	ArgP	% ArgP der Summe	Octopin	Summe
aerobe Kontrolle	8.62 (1.47)	11.29 (0.82)	57 (4)	0.30 (0.08)	20.21 (1.78)
2 Std.	10.60 (1.68)	9.73* (1.25)	48 (3)	0.25 (0.10)	20.58 (2.37)
6 Std.	12.39* (2.17)	9.40* (0.18)	44 (4)	0.28 (0.06)	22.07 (2.33)
10 Std.	14.54* (2.05)	6.71* (3.43)	30 (13)	0.44 (0.22)	21.73 (3.59)
15 Std.	14.60* (1.91)	5.74* (2.34)	28 (9)	0.59* (0.10)	20.93 (2.81)

C. Substrate und Endprodukte des Kohlehydratstoffwechsels

Dauer der Anaerobiose	Glucose-6-P	D-Lactat	Alanin	Aspartat	Succinat
aerobe Kontrolle	0.49 (0.12)	0.11 (0.06)	2.24 (0.75)	5.78 (1.18)	0.39 (0.18)
2 Std.	0.76* (0.08)	0.65* (0.31)	2.58 (1.14)	4.51 (0.76)	0.77* (0.22)
6 Std.	1.18* (0.42)	2.83* (0.82)	3.84* (0.66)	2.10* (0.93)	1.18* (0.30)
10 Std.	1.52* (0.47)	3.58* (1.08)	4.99* (1.29)	2.09* (1.41)	1.43* (0.25)
15 Std.	2.07* (0.30)	5.87* (1.51)	6.68* (1.44)	1.37* (0.99)	2.04* (0.18)

* Signifikanter Unterschied ($p<0.05$) zum aeroben Kontrollwert

Tabelle 2: Auswirkungen von 6 Std. experimenteller Anaerobiose bei 22°C nach der Injektion der Stoffwechselinhibitoren Jodacetat (JAc) und Aminooxyacetat (AOA) auf die Konzentrationen (µMol/g FG) verschiedener Metabolite des anaeroben Stoffwechsels im gesamten Weichkörper. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung (in Klammern) für die Messungen an vier Muscheln (2.2 ± 0.25 g FG).

A) Behandlung	ATP	Arg	ArgP	% ArgP der Summe	Octopin	Summe
50 µl Puffer	3.03 (0.55)	9.69 (0.97)	7.29 (1.52)	42 (4)	0.26 (0.16)	17.24 (2.32)
50 µl 100 mM JAc	0.52* (0.24)	18.80* (2.45)	1.41* (2.26)	7 (10)	0.04* (0.05)	20.24 (2.29)
50 µl 100 mM AOA	3.34 (0.64)	11.48 (1.68)	5.64 (1.29)	32 (7)	0.53 (0.30)	17.64 (1.24)

B) Behandlung	Glucose-6-P	D-Lactat	Alanin	Aspartat	Succinat
50 µl Puffer	1.09 (0.14)	2.32 (0.22)	6.19 (1.32)	3.24 (0.88)	1.23 (0.27)
50 µl 100 mM JAc	1.98* (0.22)	0.98* (0.15)	4.31* (0.73)	4.01 (0.60)	1.31 (0.25)
50 µl 100 mM AOA	1.81* (0.30)	3.31* (0.54)	3.50* (1.20)	3.93 (1.26)	0.60* (0.25)

* Signifikanter Unterschied ($p>0.05$) zur Kontrollgruppe mit Pufferinjektion

Die Messungen der Metabolitgehalte in C. tuberculatum sind für die verschiedenen Versuche nach folgenden Kriterien in maximal drei Tabellen zusammengestellt worden:
In einer Tabelle sind die Konzentrationen der Adenylate ATP, ADP und AMP angegeben. Aus den Adenylatkonzentrationen ist ihre Summe und der "energy charge" nach Atkinson (1968) berechnet worden.
In der zweiten Tabelle werden Arginin und die Metabolite Argininphosphat und Octopin, die Arginin enthalten, sowie die Summe dieser drei Metabolite und der prozentuale Anteil des Argininphosphats an dieser Summe aufgeführt.
Eine weitere Tabelle zeigt die Konzentrationen wichtiger Metabolite des anaeroben Stoffwechsels: Glucose-6-phosphat (G-6-P), D-Lactat, Alanin, Aspartat und Succinat.

1. Zeitabhängige Veränderungen von Metabolitkonzentrationen bei biotopbedingter Anaerobiose

Die Summe der Adenylate (Tabelle 1A) schwankt zwar zwischen 4.66 ± 0.37 und 5.41 ± 0.44 µMol/g FG, aber eine signifikante Veränderung ist nicht erkennbar. Entsprechendes gilt auch für die AMP-Konzentrationen, die bei den anaerob inkubierten Muschelgruppen nicht signifikant größer sind.
Die Konzentration des ATP nimmt signifikant mit der Dauer der Anaerobiose von 4.12 ± 0.60 auf 3.39 ± 0.37 µMol/g FG ab. Folglich ist der Wert des "energy charge" in den Kontrolltieren der höchste (0.88 ± 0.03), nach 6 Std. experimenteller Anaerobiose erreicht er erst Werte um 0.85 und sinkt nach 10 und mehr Std. auf Grund der Zunahme des ADP-Gehalts siginfikant unter den Kontrollwert ab (um 0.82).

Der Anteil des Argininphosphats (Tabelle 1B) an der konstanten Summe aller argininhaltigen Verbindungen nimmt in 15 Std. Anaerobiose kontinuierlich von ca. 60% auf ca. 30% ab.
Arginin wird entsprechend dem Abbau des Argininphosphats frei, eine geringfügige Umsetzung des Arginins zu Octopin ist allerdings erst nach 15 Std. experimenteller Anaerobiose signifikant nachzuweisen.

Der Gehalt an G-6-P (Tabelle 1C), dem Ausgangsstoff des glykolytischen Abbaus aller Kohlenhydrate, nimmt mit der Inkubationsdauer gleichmäßig zu, bis er schließlich etwa das Vierfache des Kontrollwerts (0.49 ± 0.12 µMol/g FG) beträgt.

Tabelle 3: Auswirkungen von 6 Std. experimenteller Anaerobiose bei 18°C auf die Konzentrationen (µMol/g FG) verschiedener Metabolite im gesamten Weichkörper nach Injektion der Stoffwechselinhibitoren Jodacetat (JAc), Aminooxyacetat (AOA) bzw. 3-Mercaptopicolinsäure (MPA). Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung (in Klammern) für die Messungen an drei oder vier (#) Muscheln (4.8 ± 0.6 g FG).

A. Behandlung	ATP	ADP	AMP	Summe	"e.c."
aerobe Kontrolle	2.35 (0.69)	1.07 (0.20)	0.15 (0.09)	3.57 (0.45)	0.80 (0.08)
100 µl Puffer	2.00 (0.45)	0.89 (0.18)	0.24 (0.06)	3.13 (0.31)	0.78 (0.06)
100 µl 100 mM JAc#	0.87* (0.21)	0.86 (0.39)	0.42 (0.17)	2.15* (0.35)	0.61* (0.07)
100 µl 100 mM AOA#	1.85 (0.22)	0.92 (0.30)	0.18 (0.17)	2.95 (0.45)	0.82 (0.11)
100 µl 50 mM MPA	2.15 (0.37)	0.72 (0.23)	0.19 (0.10)	3.06 (0.24)	0.82 (0.03)

B. Behandlung	Arg	ArgP	% ArgP der Summe	Octopin	Summe
aerobe Kontrolle	8.43 (1.38)	10.20 (2.86)	53 (8)	0.24 (0.16)	18.87 (4.78)
100 µl Puffer	9.13 (0.74)	4.67 (1.88)	32 (10)	0.43 (0.14)	14.23 (1.79)
100 µl 100 mM JAc#	15.62* (1.37)	1.90 (1.21)	11 (6)	0.20 (0.08)	17.72 (2.33)
100 µl 100 mM AOA#	9.24 (2.13)	4.04 (2.15)	26 (8)	0.40 (0.05)	13.68 (3.97)
100 µl 50 mM MPA	12.32* (0.37)	5.65 (3.04)	30 (13)	0.34 (0.08)	18.31 (2.69)

Fortsetzung Tab. 3 auf der nächsten Seite

C. Behandlung	Glucose-6-P	D-Lactat	Alanin	Aspartat	Succinat
aerobe Kontrolle	0.33 (0.02)	0.05 (0.01)	2.10 (0.68)	3.06 (1.55)	0.29 (0.03)
100 µl Puffer	1.48 (0.15)	1.45 (0.35)	4.74 (0.33)	1.62 (0.50)	1.51 (0.52)
100 µl 100 mM JAc#	2.01* (0.16)	0.59* (0.10)	3.66 (0.81)	0.59* (0.26)	1.20 (0.43)
100 µl 100 mM AOA#	1.30 (0.34)	1.82 (0.50)	3.69 (1.08)	2.99* (0.72)	0.89 (0.44)
100 µl 50 mM MPA	1.90 (0.67)	0.97 (0.30)	3.36* (0.49)	1.11 (0.13)	0.73* (0.26)

* Signifikanter Unterschied ($p>0.05$) zur Gruppe mit reiner Pufferinjektion

Tabelle 4: Die Änderungen der Konzentrationen (ΔµMol/g FG) von ATP, Argininphosphat, Octopin, D-Lactat, Alanin, Succinat und Aspartat während sechsstündiger Inkubation in sauerstofffreiem Seewasser ohne und mit verschiedenen Stoffwechselinhibitoren. Die Änderungen wurden aus den Werten in Tabelle 2 (A) bzw. 3 (B) errechnet.

A) Versuchsreihe im September 1983 bei 22°C

Behandlung	ATP	ArgP	Octopin	D-Lactat	Alanin	Aspartat	Succinat
ohne"	-0.33	-1.56	-	2.72	1.26	-3.68	0.79
	(30%)´	(39%)		(123%)	(35%)	(145%)	(94%)
Puffer	-1.09	-4.00	-	2.21	3.61	-2.54	0.84
	(100%)	(100%)		(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
JAc	-3.60	-9.88	-	0.87	1.43	-1.77	0.92
	(330%)	(247%)		(40%)	(39%)	(70%)	(110%)
AOA	-0.78	-5.65	0.23	3.20	0.92	-1.21	0.21
	(72%)	(141%)		(145%)	(25%)	(48%)	(25%)

B) Versuchsreihe vom Mai 1984 bei 18°C

Behandlung	ATP	ArgP	Octopin	D-Lactat	Alanin	Aspartat	Succinat
Puffer	-0.35	-5.53	0.19	1.40	2.64	-1.44	1.22
	(100%)´	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
JAc	-1.48	-9.30	-	0.54	1.56	-2.47	0.91
	(423%)	(168%)		(39%)	(59%)	(172%)	(75%)
AOA	-0.50	-6.16	0.16	1.77	1.59	-0.07	0.60
	(143%)	(111%)	(84%)	(126%)	(60%)	(5%)	(49%)
MPA	-0.20	-4.55	0.10	0.92	1.26	-2.28	0.44
	(57%)	(82%)	(53%)	(66%)	(48%)	(158%)	(36%)

´ Relative Änderung der Konzentrationen mit Inhibitor gegenüber der Gruppe allein mit Pufferinjektion (Imidazol/Seewasser-Gemisch)

" Die Werte aus Tabelle 4A wurden mit denen der Kontrollgruppe und der dazugehörigen Gruppe nach 6 Std. der Anaerobiose verglichen, die in Tabelle 1 dargestellt ist.

Ebenso gleichmäßig nimmt die D-Lactat-Konzentration während der Anaerobiose über 50fach zu, nämlich von 0.11 ± 0.06 auf 5.87 ± 1.51 µMol/g FG. L-Lactat ist in frisch hergestellten Extrakten nicht als anaerobes Endprodukt nachzuweisen.

Beim L-Alanin setzt erst nach 2 Std. anaerober Inkubation die kontinuierliche Erhöhung des Gehalts von 2.24 ± 0.57 auf 6.68 ± 1.44 µMol/g FG ein. Das in marinen Invertebraten häufige Isomer D-Alanin wurde in Extrakten von C. tuberculatum nicht gefunden.

Die Abnahme des Aspartats erfolgt innerhalb von 6 Std. der Anaerobiose linear von 5.78 ± 1.18 auf 2.10 ± 0.93 µMol/g FG. Eine weitere Verminderung des Aspartat-Gehalts ist erst nach 15 Std. festzustellen.

Der Gehalt von Succinat in den Geweben steigt gleichmäßig innerhalb von 15 Std. der Anaerobiose von 0.39 ± 0.18 µMol/g FG auf das ca. Fünffache des Kontrollwertes.

Die flüchtigen Fettsäuren Propionat und Acetat konnten bei C. tuberculatum in keiner der untersuchten Phasen experimenteller Anaerobiose nachgewiesen werden.

Das Vorhandensein oder eine Bildung von Strombin war in C. tuberculatum nicht nachzuweisen. Dagegen war Alanopin immer in Spuren vorhanden, quantifizierbare Mengen konnten aber nur nach 15 Std. der Anaerobiose festgestellt werden (0.18 ± 0.02 µMol/g FG).

2. Die Wirkung von Stoffwechselinhibitoren auf die Bildung von Endprodukten im Verlauf der biotopbedingten Anaerobiose

Für diese Versuche wurde eine Dauer von 6 Std. anaerober Inkubation gewählt, weil nach Ablauf dieser Zeitspanne bei allen Metaboliten deutliche Veränderungen nachzuweisen waren (s.o.) und zudem auch alle Muscheln, denen ein Inhibitor injiziert worden war, überlebten. Besonders die Muscheln, denen JAc appliziert worden war, waren am Ende dieser relativ kurzen Anaerobiosedauer schon in äußerst schlechter Verfassung.

Die Wirkung der verschiedenen Inhibitoren läßt sich nur aus dem Vergleich der verschiedenen Muster der Endprodukte nach anaerober Inkubation ohne und mit Inhibitor ablesen. Daher wurden aus den Meßwerten, die in den Tabellen 2 und 3 angegeben sind, die Veränderungen der Konzentrationen nach 6 Std. Anaerobiose

gegenüber den aeroben Kontrollgruppen errechnet (Tabelle 4).
Für den Vorversuch (Sept. 1983) wurden als aerobe Kontrollgruppe die Tiere der Versuchreihe vom Oktober 1981 (Tabelle 1) herangezogen, um die Veränderungen in den Metabolitkonzentrationen zu berechnen. Diese Veränderungen wurden mit denen jener 6 Std.-Anaerobiose-Gruppe verglichen, um den Effekt der Manipulation selbst zu erfassen.
Dieser Vergleich zeigt, daß durch die Injektion des Imidazol/Seewasser-Gemischs sowohl der Abbau des ATP und des Argininphosphats als auch die Bildung von Alanin innerhalb der 6 Std. experimenteller Anaerobiose gegenüber den unbehandelten Muscheln verdoppelt worden waren (Tabelle 4A). Der Abbau von Aspartat scheint nicht so stark gewesen zu sein, die Bildung von D-Lactat und Succinat wurde durch die Manipulationen wenig betroffen.
Um die Wirkung der Inhibitoren auf die Endproduktbildung deutlich zu machen, wurden die durch die Inhibitorinjektion veränderten Werte mit denen der zugehörigen Anaerobiose-Gruppe verglichen, der nur das Lösungsgemisch injiziert worden war.

a) Die Wirkung des Glykolyseinhibitors Jodacetat

Ist den Muscheln zu Beginn der sechsstündigen Inkubationzeit JAc injiziert worden, so liegt während der Dauer der Anaerobiose in beiden Versuchsreihen der ATP-Verbrauch mehr als dreimal so hoch (Tabelle 4), wodurch auch der Wert des "energy charge" drastisch abnimmt, obwohl auch die Summe aller Adenylate signifikant verringert wird. Ebenso sinken die Argininphosphatreserven auf ca. 10% der Summe aller argininhaltigen Verbindungen (Tabelle 2A und 3A). Die großen Unterschiede dieser Summen für die verschiedenen Gruppen sind nicht signifikant.
Die Bildung von D-Lactat wird um 61% verringert, die des Alanins reduziert sich nicht ganz so einheitlich um 60% bzw. 41% (Tabelle 4).
JAc beeinflußt die Bildung von Succinat nur geringfügig.
Im Vorversuch ist auch der Aspartatabbau nur leicht reduziert worden (Tabelle 4A), bei der Versuchsreihe vom Mai 1984 wurde im Gegensatz dazu eine deutliche Verstärkung des Abbaus festgestellt (Tabelle 4B).

b) Die Wirkung des Transaminaseinhibitors Aminooxyacetat

Eine Injektion von AOA bewirkt nach 6 Std. Anaerobiose gegenüber der nur mit

Tabelle 5: Die Konzentrationen (µMol/g FG) der freien Aminosäuren im gesamten Weichkörper aerober Kontrolltiere, sowie dem Fuß aerober Kontrolltiere und von Muscheln, die 15 Std. in sauerstofffreiem Seewasser inkubiert wurden. Angegeben ist der Mittelwert von drei Muscheln mit der Standardabweichung (in Klammern).

Aminosäure	gesamter Weichkörper Kontrolltiere	Fußgewebe Kontrolle	Fußgewebe 15 Std. Anaerobiose
Phosphoserin	0.42 (0.08)	-	-
Taurin	52.39 (11.05)	123.13 (32.03)	103.09 (10.34)
Aspartat	4.72 (0.65)	3.47 (0.57)	0.34* (0.37)
Threonin	0.58 (0.38)	0.16 (0.14)	0.21 (0.08)
Serin	0.48 (0.11)	0.17 (0.08)	0.31 (0.27)
Asparagin	1.37 (0.16)	-	-
Glutamat	3.43 (0.94)	2.50 (0.51)	3.37 (1.84)
Glutamin	3.32 (0.90)	2.46 (0.80)	2.14 (0.95)
Glycin	0.74 (0.40)	0.19 (0.07)	0.25 (0.09)
Alanin	2.17 (0.75)	2.69 (1.64)	6.99* (0.75)
Valin	-	0.15 (0.13)	0.27 (0.11)
Cystein	-	0.02 (0.01)	0.02 (0.01)
Methionin	-	0.07 (0.05)	0.09 (0.06)
Cystin	-	0.04 (0.04)	0.05 (0.11)
Isoleucin	-	0.13 (0.05)	0.20 (0.04)
Leucin	-	0.11 (0.02)	0.18 (0.01)
Tyrosin	-	11.54 (1.38)	11.33 (1.84)
Phenylalanin	-	< 0.01	0.03 (0.02)
Ethanolamin	-	0.33 (0.23)	0.32 (0.06)
NH_3	-	0.32 (0.09)	0.30 (0.03)
Ornithin	-	0.06 (0.05)	0.02 (0.02)
Lysin	-	0.30 (0.09)	0.35 (0.13)
Histidin	-	0.15 (0.01)	0.17 (0.03)
Arginin	-	19.17 (1.80)	18.29 (1.97)

- nicht bestimmt * Die Unterschiede sind signifikant bei $p<0.01$.

Imidazol/Seewasser-Gemisch behandelten Gruppe eine etwa 1.4fache Verstärkung des Verbrauchs von ATP und/oder Argininphosphat.
Deutlich ist die Zunahme der D-Lactatbildung um 26% bzw. 45%, der jedoch eine Reduzierung der Succinatbildung auf 25% bzw. 49% gegenübersteht.
Unterschiedlich ist in beiden Versuchsreihen die Auswirkung des AOA auf die Hemmung des Aspartatabbaus und der Alaninbildung. Im Vorversuch wird durch AOA die Bildung des Alanins (um 75% reduziert) mehr beeinflußt als der Abbau des Aspartats (um 51% reduziert, Tabelle 4A). Dagegen war der Effekt des AOA in der Versuchsreihe vom Mai 1984 auf die Umsetzung des Aspartats stärker, die fast ganz verhindert (nur 5%) wurde, als auf die Alanin-Bildung, die nur zu 51% (nicht signifikant) gehemmt wurde.

c) Die Wirkung des PEPCK-Inhibitors 3-Mertcaptopicolinsäure

Die Applikation von MPA vor dem Beginn der Anaerobiose verstärkt im Ganztier den Abbau von Aspartat (ca. 1.6fach) geringfügig. Alle anderen Veränderungen sind gegenüber denen der Vergleichsgruppe reduziert, die Bildung von Succinat auf 36%, die des Alanin und D-Lactat auf 48% bzw. 66%, sowie der Abbau von ATP und Argininphosphat auf 57% bzw. 82% (Tabelle 4B).

3. Freie Aminosäuren

Vergleicht man die Konzentrationen freier Aminosäuren im Ganztier (Tabelle 5) mit denen im Fußgewebe, so sind sie im Ganztier mit Ausnahme des Taurins (ca. 50%) ungefähr gleich oder, bei sehr niedrigen Konzentrationen, im Ganztier höher.
Die signifikanten Veränderungen ($p>0.01$) der Gehalte bestimmter Aminosäuren im Fuß während 15 Std. der Anaerobiose beschränken sich auf die Abnahme von Aspartat einerseits und die Zunahme von Alanin andererseits. Es läßt sich keine Veränderung des Gehalts der Aminosäuren Glutamat und Glutamin oder des Ammoniak feststellen, die eine potentielle Funktion als Spender oder Speicher von Aminogruppen haben.

4. Die Energieausbeute des anaeroben Stoffwechsels

Da die für die Entstehung der Endprodukte relevanten Stoffwechselwege mit den

Tabelle 6: Berechnung der Konzentrationsänderungen (µMol/g FG) des ATP, Argininphosphat und der Endprodukte für verschiedenen Perioden biotopbedingter Anaerobiose aus den Werten in Tabelle 1. In Klammern darunter stehen die daraus zu errechnenden ATP-Äquivalente (µMol ATP/g FG).

anaerobe Periode	ATP (x1.0)	ArgP (x1.0)	Octopin (x1.5)	D-Lactat (x1.5)	Alanin (x1.5)	Succinat (x1.0)
0 - 2 Std.	0.04	1.56	-	0.54	0.34	0.38
	(0.04)	(1.56)		(0.81)	(0.51)	(0.38)
2 - 6 Std.	0.29	0.33	-	2.18	1.26	0.41
	(0.29)	(0.33)		(3.27)	(1.89)	(0.41)
6 - 10 Std.	0.13	2.63	0.16	0.75	1.15	0.25
	(0.13)	(2.63)	(0.24)	(1.13)	(1.73)	(0.25)
10 - 15 Std.	0.27	0.97	0.15	2.29	1.69	0.61
	(0.27)	(0.97)	(0.23)	(3.44)	(2.54)	(0.61)

Tabelle 7: Gegenüberstellung der ATP-Äquivalente aus den Phosphagenen ATP und Argininphosphat, aus den Glykolyse-Endprodukten und aus der Succinat-Bildung für die verschiedenen Perioden des Stoffwechsels, errechnet nach Tabelle 6.

anaerobe Periode	ATP-Äquivalente (µMol/g FG) aus Phosphagenen	Glykolyse´	Succinat	total	ATP-Verbrauchsrate (µMol ATP/g FG/Min.)
0 - 2 Std.	1.60	1.32	0.38	3.30	0.028
	(48.5%)	(40.0%)	(11.5%)		
2 - 6 Std.	0.62	5.16	0.41	6.19	0.026
	(10.0%)	(83.3%)	(6.7%)		
6 - 10 Std.	2.76	3.10	0.25	6.11	0.026
	(45.2%)	(50.7%)	(4.1%)		
10 -15 Std.	1.24	6.21	0.61	8.06	0.027
	(15.4%)	(77.0%)	(7.6%)		
0 - 15 Std.	6.22	15.79	1.65	23.66	0.026
	(26.3%)	(66.6%)	(7.1%)		

´ Octopin, D-Lactat und Alanin
" prozentualer Anteil am gesamten ATP-Ertrag

dazugehörigen ATP-Bildungsstellen bekannt sind (s. Einführung), läßt sich errechnen, wieviel Energie in Form von ATP bei der Bildung eines bestimmten Endprodukts enstanden sein muß. Ausgehend von der Annahme, daß alle Endprodukte aus Glykogen gebildet werden, erhält man folgende ATP-Erträge: 1 µMol Argininphosphat regeneriert 1 µMol ATP, 1.5 µMol ATP entstehen pro µMol gebildetem Alanin, D-Lactat, oder Octopin und 2.5 µMol ATP pro µMol Succinat (de Zwaan und Wijsman 1976). Wird das Succinat aus Aspartat gebildet, so ist der ATP-Ertrag nur 1 µMol ATP pro µMol Succinat (de Zwaan 1983).
Da die ATP-Erträge in den Muscheln nicht gespeichert werden, sondern im Gegenteil auch das vorhandene ATP während der Anaerobiose teilweise abgebaut wird (Tabelle 1), entspricht die Summe der theoretischen ATP-Erträge dem ATP-Verbrauch des Organismus. In Tabelle 6 sind aus den Meßwerten die Veränderungen der Metabolite während experimenteller Anaerobiose gegenüber den aeroben Kontrolltieren errechnet worden. Aus den so erhaltenen Werten wurden die entsprechenden ATP-Äquivalente abgeleitet. Es wurde dabei davon ausgegangen, daß die Bildung von Succinat in C. tuberculatum vornehmlich aus Aspartat erfolgt ist (s.u.).
Anschließend wird der Anteil der schnell verfügbaren ATP-Äquivalente aus ATP und Argininphosphat (als Phosphagene zusammengefaßt) am gesamten ATP-Ertag dem Ertrag aus der Bildung der Pyruvatderivate D-Lactat, Alanin und Octopin sowie dem aus der Succinat-Bildung gegenübergestellt.

a) Der Energieverbrauch in den verschiedenen Perioden biotopbedingter Anaerobiose

Der Anteil der Phosphagene an der gesamten ATP-Bildung (Tabelle 7) beträgt in den ersten beiden Stunden und in der Periode von der 6. bis zur 10. Std. der Anaerobiose ca. 45%, dazwischen und danach liegt er bei nur 10% bzw. 15%. Der Anteil der Succinat-Bildung an der Energiebereitstellung ist relativ gering (4.1% bis 11.5%). Demzufolge alterniert der Anteil der Glykolyse an der ATP-Bildung zwischen 40% und 83.3%.
Die Energieverbrauchsrate sinkt von 0.028 µMol ATP/g FG und Minute in den ersten beiden Stunden mit Fortdauer der Anaerobiose geringfügig auf 0.026 µMol ATP/g FG/Min. und bleibt dann konstant (Tabelle 7).

b) Die Wirkung der Stoffwechselinhibitoren auf den Energieverbrauch

Tabelle 8: Gegenüberstellung der anaerob gewonnenen ATP-Äquivalente für die Versuchsreihen der anaeroben Inkubation mit Stoffwechselinhibitoren (Tabelle 4).

A) Versuchsreihe vom September 1983 bei 22°C

Behandlung	ATP-Äquivalente´ (µMol/g FG) aus Phosphagene	Glykolyse	Succinat	total
ohne	2.22 (23.4%)"	6.48 (68.3%)	0.79 (7.1%)	9.49
Puffer	5.09 (34.8%)	8.73 (59.5%)	0.84 (5.7%)	14.66
JAc	13.48 (75.5%)	3.45 (19.3%)	0.92 (5.2%)	17.85
AOA	6.43 (48.8%)	6.53 (49.6%)	0.21 (1.6%)	13.17

B) Versuchsreihe vom Mai 1984 bei 18°C

Behandlung	ATP-Äquivalente (µMol/g FG) aus Phosphagen	Glykolyse	Succinat	total
Puffer	5.88 (43.7%)	6.35 (47.2%)	1.22 (9.1%)	13.45
JAc	10.78 (72.6%)	3.15 (21.2%)	0.91 (6.2%)	14.84
AOA	6.66 (53.1%)	5.28 (42.1%)	0.60 (4.8%)	12.54
MPA	4.75 (55.2%)	3.42 (39.7%)	0.44 (5.1%)	8.61

´ Die Berechnung der ATP-Aquivlaente aus den Konzentrationsänderungen ist in Tabelle 6 angegeben.
" prozentualer Anteil am gesamten anaeroben ATP-Ertrag

Der ATP-Verbrauch während der sechsstündigen Anaerobiose nach Injektion des Imidazol/Seewasser-Gemisches ist für beide Versuchsreihen fast gleich (14.66 und 13.45 µMol ATP/g FG). Das ist aber ca. das 1.5fache des Energieverbrauchs, den die unbehandelten Muscheln im gleichen Zeitraum hatten. Der Anteil der Phosphagene an der Energiebereitstellung ist durch die Manipulationen stark gestiegen. Dadurch erscheinen die übrigen Anteile geringer, obwohl die absoluten ATP-Erträge größer geworden sind (Tabelle 8). Die Glykolyse liefert dennoch wieder den wichtigsten Energie-Beitrag.

Bei Einsatz von JAc steigt der ATP-Verbrauch nochmals, wobei ca. 75% der Energie von den Phosphagenen geliefert wird. Das Energieaufkommen durch die Glykolyse mit ca. 20% ist gering, das aus der Succinat-Bildung (ca. 5%) ist quantitativ ohne Bedeutung.

Wird AOA injiziert, so ist der gesamte ATP-Verbrauch dem der Gruppen, denen nur der Imidazol/Seewasser-Puffer injiziert wurde, vergleichbar. Die Anteile der Phosphagene am gesamten ATP-Ertrag sind in diesem Fall allerdings größer und denen der Glykolyse sehr ähnlich (42.1% - 53.1%). Der Beitrag des Succinats wird z.T. sehr stark zurückgedrängt.

Nach der Injektion von MPA ist der ATP-Verbrauch gegenüber den Gruppen mit JAc oder AOA geringer und dem der unbehandelten anaeroben Gruppe ähnlich. Auch in diesem Inhibitorversuch sind die Phosphagene hauptsächlicher Energielieferant (55.2%). Der Energiebeitrag der Succinat-Bildung ist demgegenüber fast auf die Hälfte reduziert worden (Tabelle 8B).

IV. Diskussion

1. Das Schema des Stoffwechsels der Herzmuschel C. tuberculatum bei biotopbedingter Anaerobiose

Frühere Untersuchungen zum anaeroben Stoffwechsel der Herzmuschel C. tuberculatum betrachteten nur den Fußmuskel allein (Gäde 1980c). Vergleicht man nun diese älteren Ergebnisse mit den hier vorliegenden, die den gesamten Weichkörper des Tieres berücksichtigen, so erkennt man, daß sie hinsichtlich der Stoffwechselwege und deren Endprodukte in wesentlichen Teilen übereinstimmen. D-Lactat ist das mengenmäßig bedeutendste Endprodukt des Glykogenabbaus (ca. 6 µMol/g FG in 15 Std.) während biotopbedingter Anaerobiose. Seine Akkumulation erfolgt proportional zur Anaerobiosedauer (Abb. 2). Die Produkte der übrigen

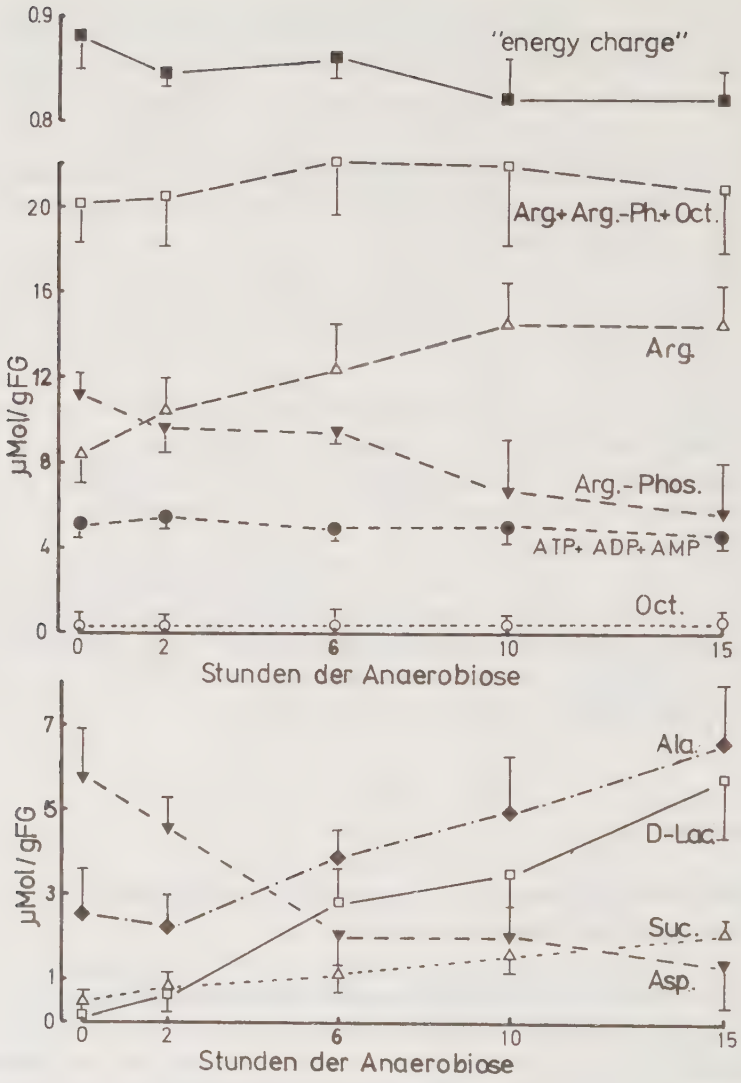

Abb. 2: Die Änderungen des "energy charge" und des Gehalts der argininhaltigen Verbindungen (mittlere Figur) sowie verschiedener anderer Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels (untere Figur) im gesamten Weichkörper (n=5) während verschiedener Phasen der biotopbedingten Anaerobiose (siehe Tab. 1).

Dehydrogenasen, die mit der LDH um das Pyruvat konkurrieren, werden entweder nur in unbedeutenden Mengen (Octopin und Alanopin) oder überhaupt nicht (Strombin) gebildet.

Während der gesamten Dauer der Anaerobiose ist neben D-Lactat das L-Alanin ein Endprodukt von ähnlich großer Bedeutung. Es kann ebenso wie D-Lactat aus Pyruvat durch eine Transaminierungsreaktion der Aminogruppe des Glutamats gebildet werden. Das Glutamat wiederum wird durch den Aspartat-Abbau via GOT regeneriert. Betrachtet man die ganze Spanne der 15 Std. experimenteller Anaerobiose, so stimmt die Menge des abgebauten Aspartats (4.2 µMol/g FG) weitgehend mit der des gebildeten Alanins (4.1 µMol/g FG) überein. Entsprechend sind auch die Konzentrationen von Glutamat und Glutamin, die bei der Übertragung der Aminogruppen beteiligt sind, im Fußmuskel nach 15 Std. Anaerobiose nur sehr wenig verändert. Es überrascht jedoch, daß der Verlauf des Aspartat-Abbaus nicht dem der Alanin-Bildung entspricht (Abb. 2).

Der raschen Abnahme des freien Aspartats in der Anfangsphase der Anaerobiose steht eine nur sehr geringe Alanin-Bildung gegenüber (Tabelle 3, Abb. 2). Auch der zwischenzeitliche Verbleib der Aminogruppe oder das Schicksal des Kohlenstoffgerüsts des Aspartats (Oxalacetat) konnte nicht geklärt werden. So entspricht die Bildung von 1.6 µMol Succinat/g FG in 15 Std. Anaerobiose nur einem Teil der freigesetzten Menge an Oxalacetat. Die Succinatmenge entspricht auch der theoretischen Kohlenstoff- und Stickstoffbilanz (siehe Einführung)

2 Aspartat + 1 Pyruvat ---> 1 Succinat + 2 Alanin + CO_2

in etwa nur nach 15 Std. Anaerobiose.

Die Umwandlung von Aspartat in Succinat bedeutet zwar einen Energiegewinn von einem Mol ATP pro Mol Succinat, das in der Fumaratreduktase-Reaktion gebildetet wird (Schroff und Schöttler 1977, Holwerda und de Zwaan 1979). Wichtiger als für die Energiegewinung ist diese Umsetzung aber wahrscheinlich für die Redoxbilanz, denn durch die nötigen Zwischenschritte lassen sich zwei Mol NAD^+/Mol Succinat regenerieren, ohne daß bei der Mobilisierung des Aspartat $NADH+H^+$ entsteht, wie es bei der Glykolyse der Fall ist. Die Reduktion des Oxalacetats läuft im Cytoplasma ab, d.h. die beteiligte MDH übernimmt die Rolle der LDH beim Ausgleich der Redoxbilanz (s. Abb. 1).

Um deutlich zeigen zu können, daß die Bildung von Succinat aus dem Oxalacetat des Aspartats erfolgt, wurden Versuche durchgeführt, in deren Verlauf einzelne Wege des anaeroben Stoffwechsels gezielt durch Hemmstoffe ausgeschaltet wurden. Ist die Glykolyse und damit die Pyruvatbildung durch JAc gehemmt, so ist auch während der Anaerobiose die Anhäufung von Octopin, Alanin und besonders von

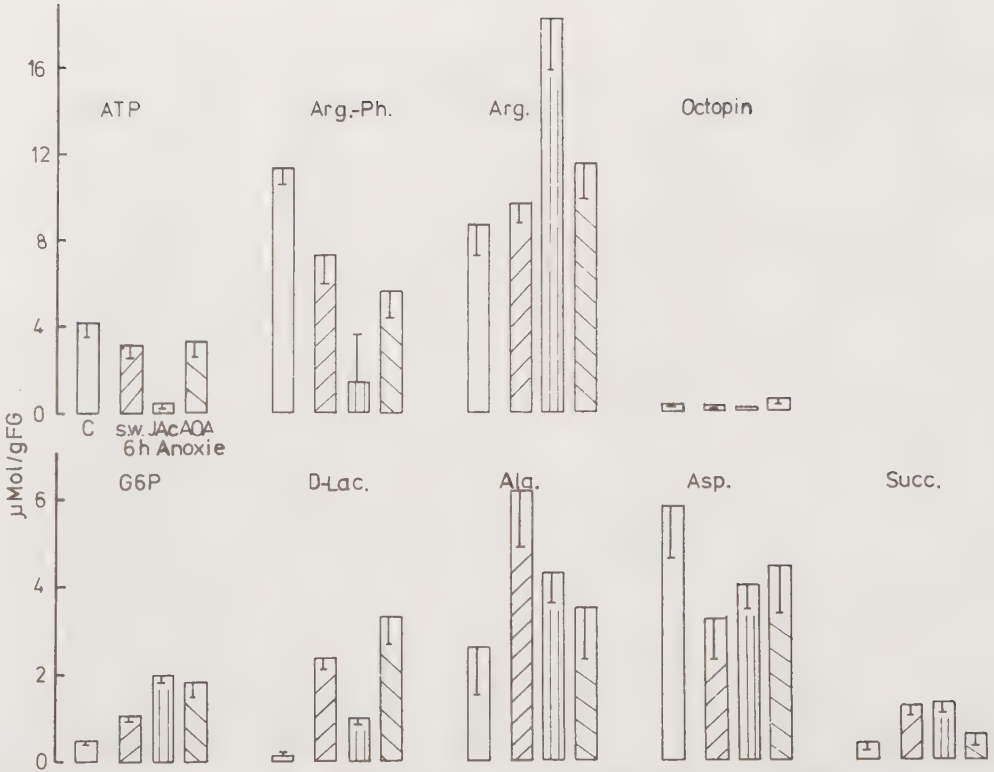

Abb. 3: Der Einfluß der Stoffwechselinhibitoren Jodacetat (JAc) und Aminooxyacetat (AOA) sowie des Seewasser/Imidazol-Gemisches (S.W.) auf den Gehalt verschiedener Metabolite während 6 Std. anaerober Inkubation im Vergleich mit der aeroben Kontrollgruppe (C). (s. Tabelle 2).

D-Lactat geringer. Die Bildung von Succinat wird dagegen nicht oder nur wenig beeinflußt (Tabelle 4, 7 und 8). Der Ausgleich der verminderten glykolytischen ATP-Produktion erfolgt lediglich durch den vermehrten Abbau der Phosphagene, aber nicht durch vermehrte Succinat-Bildung. Die Kapazität dieses Stoffwechselweges scheint schon voll ausgeschöpft zu sein. JAc hatte beim Vorversuch auf die Produktion von Alanin und D-Lactat den gleichen hemmenden Einfluß. Man kann daher annehmen, daß der Pyruvatanteil des Alanins aus der Glykolyse stammt und nicht auf dem Wege der Decarboxylierung von Malat gebildet wurde, denn sonst müßte die Alanin-Bildung wohl unabhängig von der Hemmung der Glykolyse sein.

Die Verhinderung der Alanin-Bildung durch die Hemmung des Enzyms GPT wird mittels einer erhöhten Umsetzung von Pyruvat zu D-Lactat und Octopin fast ausgeglichen (Tabelle 4). Die hemmende Wirkung von AOA auf die Alanin- und Succinat-Bildung war im Vorversuch (Sept. 1983) mit 75% Reduktion deutlicher als die auf den Aspartat-Abbau (51% Reduktion). Ein anderes Resultat zeigt das Wiederholungsexperiment (Mai 1984): Die Wirkung des AOA auf den Aspartat-Abbau war sehr deutlich (95% Hemmung), wohingegen die Verminderung der Succinat- bzw. Alanin-Produktion gering war (51% bzw. 40%).

Die Bildung von Succinat und Alanin scheint teilweise unabhängig von der Aspartat-Mobilisierung zu sein. Dennoch wird die Succinat-Bildung nur durch die Hemmung der Transaminasen beeinflußt, nicht aber durch die Hemmung der Glykolyse (Abb. 3).

Der Eindruck, daß bei dem Wiederholungsexperiment zumindest ein Teil des Succinats aus Glykogen gebildet wird, wurde durch die hemmende Wirkung von MPA auf die Succinat-Bildung verstärkt. Allerdings ist vor kurzem festgestellt worden, daß MPA nicht allein die Carboxylierung von PEP durch die PEPCK hemmt, sondern auch das Enzym Succinyl-Coenzym A-Synthetase, das die Freisetzung von Succinat unter anaeroben Bedingungen katalysiert (U. Schöttler, Münster, persönliche Mitteilung). Demzufolge hätte MPA auch eine hemmende Wirkung auf die Succinatbildung aus Aspartat.

Nicht erklärt werden kann, warum der Einsatz von MPA zudem so deutliche Verminderungen der D-Lactat- und besonders der Alanin-Bildung bewirkt.

Die bereits geschilderten Unterschiede im Ablauf des anaeroben Stoffwechsels, die bei *C. tuberculatum* beobachtet wurden, könnten zum Teil auf saisonale Schwankungen zurückzuführen sein. Sie wurden auch schon für die Miesmuschel *Mytilus edulis* beschrieben (Zurburg *et al.* 1979, de Zwaan *et al.*

1982). In dieser Muschel ist die Succinat-Produktion im Sommer stärker ausgeprägt als zu anderen Jahreszeiten. Zudem dient dann auch im Adduktormuskel das Glykogen als Substrat der Succinat-Bildung, während im Winter in diesem Gewebe das produzierte Succinat vollständig dem Aspartat-Abbau entstammt. Erklärt wird diese Abweichung mit jahreszeitlich bedingten Änderungen der katalytischen Eigenschaften der Pyruvatkinase (PK), die im Sommer die Succinat-Bildung aus Glykogen begünstigen.
Im Analogschluß dazu kann man zu der Annahme kommen, daß eine ähnliche Modifikation der PK in C. tuberculatum zwischen Herbst und Frühjahr erfolgt ist. Zudem scheint es, daß im Herbst (Vorversuch) die GPT und damit auch die Alanin-Bildung eine höhere Affinität gegenüber einer Hemmung durch AOA hat als die GOT. Dagegen ist im Frühjahr die GOT sehr empfindlich gegenüber einer Hemmung durch AOA, die GPT dagegen nur wenig. Wenn auch in beiden Versuchsreihen die tatsächlichen Inhibitorkonzentrationen in den Tieren unterschiedlich waren, so ist sie jedoch in jedem Tier für beide Enzyme, GPT und GOT, gleich gewesen.

2. Der Energieverbrauch während biotopbedingter Anaerobiose

Während der beiden Stunden des Übergangs von aeroben zu anaeroben Bedingungen ist die ATP-Verbrauchsrate etwas höher als der konstante Wert von ca. 0.026 µMol ATP/g FG/min in der darauf folgenden Zeit biotopbedingter Anaerobiose. Dabei wechseln Perioden, in denen die Phosphagene ca. 45% der ATP-Äquivalente stellen, mit solchen, in denen sie nur ca. 10% liefern. Dieses Bild entsteht durch die unterschiedlichen Differenzen der Mittelwerte aus den uneinheitlichen Argininphosphat-Gehalten der einzelnen Muscheln. Berücksichtigt man die Standardabweichungen dieser Mittelwerte, so kann man auch einen mehr oder minder kontinuierlichen Abbau der Phosphagene annehmen (Abb. 2). Extrapoliert man den Rückgang der Argininphosphat-Reserven, der ca. 50% in 15 Std. beträgt, so kommt man zu dem Schluß, daß nach ca. 30 Std. die Reserven restlos verbraucht sein würden. Dieser Zeitpunkt entspricht in etwa der maximalen Anaerobiosetoleranz von ca. 22 h bei C. tuberculatum. Unterstützt wird diese Hypothese von der Beobachtung, daß sich diejenigen Muscheln in besonders schlechter Verfassung befanden, die nach einer Hemmung der Glykolyse ihre Argininphosphat-Reserven während 6 Std. der Anaerobiose verbraucht hatten.
Eine einfache Rechnung zeigt, daß nicht etwa die Glykogenreserven der limitierende Faktor des anaeroben Stoffwechsels sind: Die Endprodukte Octopin, D-Lactat und Alanin entsprechen mengenmäßig einem Glykogenabbau von ca. 5

µMol/g FG in 15 Std. und damit weniger als 3% der anfänglichen Glykogenreserven.

Betrachtet man den Energieverbrauch des gesamten Tieres (Tabelle 7), so sieht man, daß die Glykolyse 2/3, der Phosphagen-Abbau 1/4 und die Succinat-Bildung den kleinen Rest der ATP-Menge liefert. Dagegen beträgt im Muskelgewebe des Fußes der Anteil der Glykolyse nur 1/3, der der Phosphagene fast 2/3 des ATP-Verbrauchs (nach Gäde 1980c).

Der Beitrag der Phosphagene zur anaeroben Energiegewinnung scheint also von der Höhe der Phosphagenreserven abzuhängen, die im Fuß doppelt so groß sind wie im ganzen Tier. Da die ATP-Verbrauchsrate des Fußmuskels mit 0.031 µMol ATP/g FG/Min. (errechnet nach Gäde 1980c) der des ganzen Weichkörpers von 0.026 µMol ATP/g FG/Min. sehr ähnlich ist, ist im Fuß der Anteil der Glykolyse am ATP-Ertrag entsprechend geringer. Das Schema des anaeroben Stoffwechsels ist aber nicht verändert, da sowohl im Ganztier wie im Fußmuskel das Verhältnis der gebildeten Endproduktmengen D-Lactat:Alanin:Succinat:Octopin ungefähr 100:70:30:5 beträgt (Gäde 1980c, Tabelle 1B und C).

Da die Anhäufung bzw. der Abbau der Metabolite im ganzen Tier und im Fuß mehr oder weniger linear mit der Dauer der biotopbedingten Anaerobiose verlaufen, ist

1. das Verhältnis der gebildeten Mengen der verschiedenen Endprodukte fast gleichbleibend,
2. der Beitrag der Glykolyse, des Phosphagen-Abbaus und der Succinat-Bildung zur anaeroben ATP-Bildung relativ konstant und damit folglich auch die ATP-Verbrauchsrate.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß das Schema des anaeroben Stoffwechsels zum einen sowohl für den Fuß als auch für den ganzen Weichkörper gilt, und daß es sich auch nicht mit der Dauer der Anaerobiose ändert.

3. Die Rolle des D-Lactats als Stoffwechselendprodukt bei biotopbedingter Anaerobiose

Der Verlauf des anaeroben Stoffwechsels von C. tuberculatum ähnelt dem der Herzmuschel C. edule während der ersten 10 Stunden einer biotopbedingten Anaerobiose. Der Fußmuskel dieser Muschelart produziert in dieser Zeit ebenfalls kontinuierlich D-Lactat als wichtigstes Endprodukt der anaeroben Glykolyse. Der Beitrag der Glykolyse und der Succinat-Bildung zum ATP-Verbrauch liegt bei 65%

und die ATP-Verbrauchsrate beträgt 0.026 bis 0.030 µMol ATP/g FG/Min. (Meinardus und Gäde 1981). C. edule kann jedoch sogar Zeiträume von 72 Std. biotopbedingter Anaerobiose bei 16°C überleben. Dazu schaltet ihr anaerober Stoffwechsel nach 10 bis 15 Std., wenn die Phosphagen-Reserven erschöpft sind, auf die Bildung von Succinat und Propionat um (Gäde 1975). Zusätzlich drosselt diese Art ihren Energieverbrauch auf 0.015 µMol ATP/g FG/Min. und darunter. Noch ausgeprägter ist die Reduktion der ATP-Verbrauchsrate im Schließmuskel von M. edulis von anfänglich 0.038 auf Werte von 0.007 µMol ATP/g FG/Min. nach 24 Std. Anaerobiose (Ebberink et al. 1979). Ebenso wie bei C. edule und Anodonta cygnea geht im Verlauf der Anaerobiose der Stoffwechsel bei M. edulis von einer anfänglichen Alanin- oder D-Lactat-Bildung zur Produktion von Succinat, Propionat und Acetat über (Gäde et al. 1975, Kluytmans et al. 1975).

Hatte man zunächst noch die Bildung von D-Lactat als Endprodukt des anaeroben Stoffwechsels bei C. tuberculatum und C. edule für eine Ausnahme unter den Muscheln gehalten (Zandee et al. 1980), so mußte man inzwischen feststellen, daß auch bei anderen Arten D-Lactat ein Endprodukt der anaeroben Glykolyse ist (Kluytmans et al 1983, Nicchitta und Ellington 1983, J.H.A. Fields und M.K. Grieshaber, persönliche Mitteilung). In diesen Muschelarten findet man neben einer Akkumulation von D-Lactat auch die Bildung von Alanin. Das bedeutet, daß das im anaeroben Stoffwechsel gebildete Pyruvat auf verschiedene Reaktionen "aufgeteilt" wird. Bei C. tuberculatum und C. edule sind D-Lactat und Alanin neben einer geringen Succinat-Bildung die wichtigsten Endprodukte während der ersten 10 bis 15 Std. der Anaerobiose (Tabelle 3, Meinardus und Gäde 1981). In Tellina planata allerdings übertrifft die Menge des in 24 h Anaerobiose gebildeten Succinats und Propionats (14.4 µMol/g FG) die des Alanins und des D-Lactats ca. 2- bzw. 3.5fach (Kluytmans et al. 1983). Im phasischen Teil des Schließmuskels von Modiolus squamosus verteilt sich die Umsetzung des anaerob gebildete Pyruvat auf drei Reaktionen. Dabei ist die Alanin-Bildung in 12 Std. an der Luft mengenmäßig bedeutender als die von D-Lactat, Alanopin/Strombin oder Succinat (Nicchitta und Ellington 1983). In der Amerikanischen Herzmuschel Clinocardium nutallii wird die Menge des in 7 Std. der Anaerobiose gebildeten D-Lactats und Alanins von der des Strombins übertroffen; die Succinat-Produktion ist dagegen minimal (Fields und Grieshaber persönliche Mitteilung). Das Fehlen einer Succinat-Bildung ist dem anaeroben Stoffwechsel von C. tuberculatum und C.

nutallii gemeinsam. Unterschiedlich ist, daß stattdessen bei der einen Art D-Lactat zusätzlich zum Alanin gebildet wird, während es bei der anderen Strombin ist.

Soweit bekannt, ist C. tuberculatum die bisher einzige Muschelart, bei der D-Lactat als wichtigstes Endprodukt des anaeroben Stoffwechsels auftritt und die das Fehlen des Stoffwechselweges vom Glykogen zum Propionat nicht durch die Bildung von Alanopin oder Strombin ausgleicht.

Möglicherweise kann die Bildung spezifischer Endprodukte, die dazugehörende Ausprägung bestimmter Stoffwechselwege und folglich die Fähigkeit einer Art, anaerobe Bedingungen zu ertragen, mit ihrem speziellen Lebensraum in Zusammenhang gebracht werden. Beispielsweise ist die Miesmuschel in der Gezeitenzone periodisch anaeroben Bedingungen ausgesetzt und kann mehrere Wochen biotopbedingter Anaerobiose überleben, indem sie die Bildung von Succinat/Propionat aus Glykogen als wichtigste Energiequelle nutzt. Die Herzmuschel der Gezeitenzone C. edule und die Muschel T. planata aus dem Mittelmeer zeigen eine begrenzte Anaerobiosetoleranz von 72 bzw. 48 Std. (Boyden 1972, Kluytmans et al. 1983). Sie bilden Succinat und Propionat zusätzlich zum D-Lactat. Bei der strikt sublitoralen Art C. tuberculatum fehlt die Fähigkeit, Opine und Propionat während biotopbedingter Anaerobiose zu bilden, zudem ist die Succinat-Produktion sehr gering, wohingegen D-Lactat, eine Endprodukt der anaeroben Glykolyse, das im Cytoplasma gebildet wird, als Endprodukt des anaeroben Stoffwechsels vorherrscht.

Dies kann man dahingehend interpretieren, daß der anaerobe Stoffwechsel dieser Herzmuschelart nicht an eine anaerobe Lebensweise wirklich angepaßt ist, wie es beispielsweise bei M. edulis der Fall ist, sondern daß ihr anaerober Stoffwechsel das Fehlen der aeroben Energiegewinnung lediglich für begrenzte Zeit und dies auch nur zum Teil ausgleichen kann. Diese Form des anaeroben Stoffwechsels mag eine Folge des strikt sublitoralen Lebensraums von C. tuberculatum sein, denn normalerweise lebt diese Muschel immer unter aeroben Verhältnissen. Sie kann jedoch gelegentlich für kurze Zeit anaeroben Bedingungen ausgesetzt sein, wenn sie z.B. wegen der Nähe eines räuberischen Seesterns die Schalen geschlossen hält, oder wenn sie durch Bewegungen des Untergrund bei Sturm verschüttet wird und sich dann zur Oberfläche und damit zum Atemwasser durchgraben muß.

C. Der Energiestoffwechsel der Herzmuschel C. tuberculatum während funktioneller Anaerobiose (intensiver Muskeltätigkeit) bei aeroben und anaeroben äußeren Bedingungen

I. Die Fluchtbewegungen und ihre Auswirkungen auf den Organismus

Viele Muscheln haben eine mehr oder weniger sessile Lebensweise und ihre Aktivitäten beschränken sich auf gelegentliche Grabbewegungen des Fußes. Es gibt aber auch einige Muschelarten, wie z.B. die verschiedenen Pecten- und Lima-Arten, die sich gut nach dem Rückstoßprinzip fortbewegen können, indem sie durch schnelle Klappbewegungen der Schalenhälften Wasser ausstoßen. Das gleiche Mobilitätsprinzip verwenden auch die Cephalopoden, die durch Kontraktion der Mantelmuskulatur Wasser aus der Mantelhöhle herauspressen. Die Energie für die Kontraktionen wird dabei durch den Abbau des Argininphosphats und die Bildung von Octopin als Endprodukt der anaeroben Glykolyse bereitgestellt. Diese Arten gelten als Paradebeispiel dafür, daß bei Invertebraten die Octopin-Bildung die Funktion übernehmen kann, die im arbeitenden Vertebratenmuskel die Lactat-Bildung innehat. Neben hohen Aktivitäten der ODH findet man in den Muskelgeweben dieser sehr mobilen Arten keine oder nur geringe Aktivitäten der LDH (s. Übersichtsartikel von Gäde 1980a).

Die Herzmuschel C. tuberculatum ist in der Lage, springende Fluchtbewegungen durch kräftiges Abstoßen mit dem Fuß auszuführen, wie sie in ähnlicher Form nur von einigen marinen Gastropoden bekannt sind (Weber 1924).

Bei genauer Beobachtung kann man folgende Phasen einer solchen Fluchtbewegung unterscheiden:

1. Die Muschel öffnet ihre Schalenhälften. Sie vergrößert den Umfang und die Länge des Fußes durch hydraulischen Druck der Hämolymphe, welcher durch die Kontraktion der muskulösen Wände des Weichkörpers erzeugt wird.
2. Anschließend krümmt sie ihren Fuß um eine Schalenaußenseite zum Untergrund hin, wobei eine bestimmte dorsale Muskelpartie des Fußes besonders beteiligt ist.
3. Hat die Fußspitze Halt auf dem Untergrund gefunden, so wird der Fuß bei starrem und langgestreckten Körper plötzlich und kraftvoll durch Kontraktion des ventralen Teils gestreckt. Dadurch hebt die ganze Muschel vom Untergrund ab und landet bis zu 15 cm von der Absprungstelle entfernt.

Angeregt durch diese Beobachtungen, wurde in verschiedenen Teilen des Weichkörpers einerseits die anaerobe Kapazität des Stoffwechsel anhand der

Verteilung der die Glykolyse terminierenden Dehydrogenasen untersucht, anderseits die Anhäufung von Endprodukten und der Abbau des Argininphosphats bei funktioneller Anaerobiose gemessen.
Untersucht wurde weiterhin, bei welcher Intensität der Muskeltätigkeit, annäherungsweise gemessen als Anzahl der ausgeführten Sprüngen, die Beteiligung des anaeroben Stoffwechsels an der Energiegewinnung nachzuweisen ist. Außerdem war die Korrelation des Phosphagenabbaus mit Argininfreisetzung und der Bildung von Glykolyse-Endprodukten in Fuß- und Weichkörper bei bis zur Erschöpfung anhaltender Muskeltätigkeit von Interesse.
Bisher waren alle Untersuchungen zur funktionellen Anaerobiose mit aerob gehaltenen Muscheln in aerobem Wasser durchgeführt worden. In den vorliegenden Untersuchungen wurde versucht, anaerob vorinkubierte Muscheln zur Ausführung ihrer Fluchtbewegung zu veranlassen. Die Untersuchung der Endprodukte, die bei funktioneller Anaerobiose gebildet werden, wenn sich der ganze Organismus schon auf einen anaeroben Stoffwechsel mit D-Lactat-Bildung eingestellt hat, sollte weitere Aufschlüsse über die Bedingungen der Funktionen der verschiedenen terminalen Dehydrogenasen der Glykolyse liefern.

II. Aufbau, Durchführung und Auswertung der Versuche

1. Versuchstiere

Die für diese Untersuchungen verwendeten Exemplare von C. tuberculatum wurden zwischen September und November 1981 sowie im Mai 1982 im Golf von Neapel, Italien, gesammelt. Entsprechend der Wassertemperatur des Golfs wurden die Muscheln bei 16 bis 22°C in der Stazione Zoologica di Napoli in Becken mit 250 l gut belüfteten Seewassers gehältert, deren Boden mit Sand bedeckt war. Auch der Seestern Astropecten auranticus stammte aus dem Golf von Neapel.

2. Enzyme, Cosubstrate und Chemikalien

Es wurden Enzyme und Substanzen gleicher Herkunft verwendet, wie sie bereits in Material und Methoden des Teils B beschrieben worden sind.
Ein Rohextrakt aus A. auranticus wurde hergestellt, indem der zerteilte Seestern durch den Fleischwolf gedreht und dann mit 5 Volumenteilen (w/v)

Seewasser verrührt wurde. Der trübe Überstand dieses Homogenats wurde bei 0°C aufbewahrt.

3. Versuchsaufbau

C. tuberculatum wurde durch Kontakt mit dem Extrakt des Seesterns A. auranticus veranlaßt, ihre springende Fluchtbewegung wiederholt auszuführen, so daß der Zustand funktioneller Anaerobiose in den Muskelgeweben eintreten konnte. Hierzu wurden einzelne Muscheln in ein großes, flaches Becken (1 x 2 m) gelegt, das bis zu einer Höhe von 7 cm mit belüftetem Seewasser gefüllt war und dessen Boden eine dünne Sandschicht bedeckte. Den Muscheln, die ihre Schalen nach einer kurzen Phase der Anpassung nicht mehr fest geschlossen hielten, wurde mit einer Spritze Seestern-Extrakt auf den Mantelrand pippetiert. Typischerweise reagieren die Muscheln auf die erste Reizung mit 5 bis 8 Fluchtbewegungen, setzen aber bei erneuter Reizung die Flucht unmittelbar mit jeweils 8 bis 15 aufeinanderfolgenden Sprüngen bis zur Erschöpfung fort. Die meisten Muscheln führen ca. 30 Fluchtbewegungen aus, aber es wurden sogar bis zu 75 Sprünge innerhalb von 2 Minuten beobachtet.

a) Aufteilung des muskulösen Weichkörpers in verschiedene Partien

Entspechend der genauen Analyse des Bewegungsablaufs (s. Einleitung), wurde zum einen die Verteilung der Aktivitäten von ODH, AlDH, StDH und LDH in verschiedenen Teilen der Körperwand und des sehr beweglichen Fußes, sowie im phasichen und tonischen Teil des Schließmuskels gemessen. Zum anderen wurde analysiert, in welchem Ausmaß diese verschiedenen Muskelpartien den anaeroben Stoffwechsel bei funktioneller Anaerobiose (bei 22°C) zur Energiegewinnung heranziehen.

b) Metabolische Veränderungen bei fortgesetzter Muskeltätigkeit

In einer Versuchsreihe (17°C) wurden 21 Muscheln, nachdem sie eine unterschiedliche Anzahl von Sprüngen ausgeführt hatten, geöffnet und die Füße herausgetrennt. Diese wurden einzeln auf Veränderungen der Konzentrationen bestimmter Metabolite analysiert. In einer zweiten Versuchsreihe (20°C) wurden im gesamten Weichkörpern von 16 Muscheln die Metabolite nach unterschiedlicher Muskeltätigkeit bestimmt.

c) Muskeltätigkeit nach anaerober Vorinkubation

Zusätzlich wurden Muscheln, die zuvor 6 Std. in sauerstofffreiem Seewasser inkubiert worden waren, dazu veranlaßt, in hypoxischem Seewasser (16°C, Po_2 = 50 Torr) ihre Fluchtbewegungen auszuführen. Die Muscheln reagierten, ebenso wie die aerob gehaltenen, innerhalb von 5 Sekunden auf die Reizung mit Seestern-Extrakt, aber die Frequenz der Sprünge schien unter diesen Bedingungen etwas langsamer zu sein.

4. Messung der Enzymaktivitäten

Der Körper von C. tuberculatum wurde aus der Schale herausgetrennt und in entsprechende Partien (s.o.) zerteilt. Die einzelnen Gewebsstücke wurden auf Filterpapier abgetupft, in kleine Stückchen zerschnitten und sofort im 10fachen Volumen (w/v) eiskalten Kalium-Phosphat-Puffers (pH 7.6, 1 mM EDTA, 14 mM Mercaptoethanol) mit einem Ultra-Turrax-Homogenisator 2 x 30 Sekunden homogenisiert. Nach Zentrifugation des Homogenats (30 Minuten bei 30000xg) wurde der Überstand über eine vorgefertigtes Sephadex G-25 Säule mit 9 ml Volumen (Pharmacia, Freiburg, F.R.G.) gegeben, um die niedermolekularen Substanzen von den Proteinen zu trennen. In den so vorbehandelten Extrakten wurden sofort spectrophotometrisch (Wellenlänge 340 nm) die Aktivitäten der Dehydrogenasen bei 25°C gemessen.
Das Testvolumen betrug 1 ml und die Bedingungen (Endkonzentrationen) waren 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7.0, 0.15 mM NADH, 2.5 mM Pyruvat für die Bestimmung der Aktivität der LDH, plus 5 mM Arginin, 100 mM Alanin oder 200 mM Glycin für die Bestimmungen der Aktivitäten von ODH, AlDH bzw. StDH.

5. Entnahme und Lagerung der Gewebe, Bereitung der Perchlorsäureextrakte und Bestimmung der Metabolite

Die Weiterbehandlung der Gewebe nach Versuchsende, die Extraktion der Gewebe mit Perchlorsäure und die Bestimmung der Metabolite erfolgte genau nach den in "Material und Methoden" des Teils B angegebenen Verfahren.

6. Statistische Auswertung der Daten

Die Signifikanz der Konzentrationsänderungen von Metaboliten während funktioneller Anaerobiose wurde durch die Prüfung mit dem "Student´s t-Test" festgestellt. Alle Vergleiche von Mittelwerten wurden auf dem Niveau zweiseitiger 5%iger Ablehnungswahrscheinlichkeit gemacht. Die Beziehung zwischen der Anzahl der ausgeführten Fluchtbewegungen (Sprünge) und den metabolischen Veränderungen wurde durch lineare Regression quantifiziert.

III. Ergebnisse

Die eingehende Untersuchung der Anatomie von C. tuberculatum zeigt, daß bei dieser Muschel nicht nur der Schließmuskel und der Fuß reine Muskelgewebe sind, sondern daß im Gegensatz zu anderen Muschelarten die Wand des Eingeweidesacks sehr muskulös ist und man dort, wo die Ansatzstellen des Körpers und der Schalenhälften sind, besonders kräftige Muskeln vorfindet. Der Teil des Körpers, der die Eingeweide umschließt, hat am Frischgewicht des gesamten Weichkörpers einen Anteil von 34.5% $\pm$ 0.8% (n = 5). Der Fuß, der sich durch die intensive Rotfärbung vom übrigen Körper abhebt, hat einen Gewichtsanteil von 19.5% $\pm$ 0.9% und die Schließmuskeln als weiteres Muskelgewebe einen Anteil von 7.9% $\pm$ 0.8%. Demzufolge entfallen auf die Nichtmuskelgewebe Mantel (14.3% $\pm$ 3.0%), Kiemen (8.7% $\pm$ 0.9%), Hepatopankreas (9.6% $\pm$ 1.7%) und den dann verbleibenden Rest (5.5% $\pm$ 1.7%) noch knapp 40% des gesamten Frischgewichts. Mißt man die Verteilung der Aktivitäten der LDH, ODH, AlDH und StDH in einzelnen Muskelpartien (Abb. 4), so stellt man fest, daß diese in der Wand des Körpers gleichmäßig verteilt sind und den Aktivitäten im größten Teil des Fußes entsprechen. Im Fuß selbst findet man einen Gradienten der Enzymaktivitäten: Die massive Fußspitze weist eine 10mal höhere LDH-, 2mal höhere ODH- und 1.5mal höhere AlDH-Aktivität als die körpernahen (proximalen) Teile des Fußes auf. Aber diese Spitze macht nur etwa 1.6% des gesamten muskulösen Gewebes aus.
Zwei weitere Regionen des Fußes unterscheiden sich hinsichtlich der gemessenen Enzymaktivitäten vom übrigen Muskelgewebe: Im dorsalen proximalen Teil ist die Aktivität der LDH doppelt so hoch und im sehr festen, irisierenden dorsalen Teil des Fußes am Übergang vom Fuß zum Eingeweidesack sind die Aktivitäten aller Dehydrogenasen niedriger.

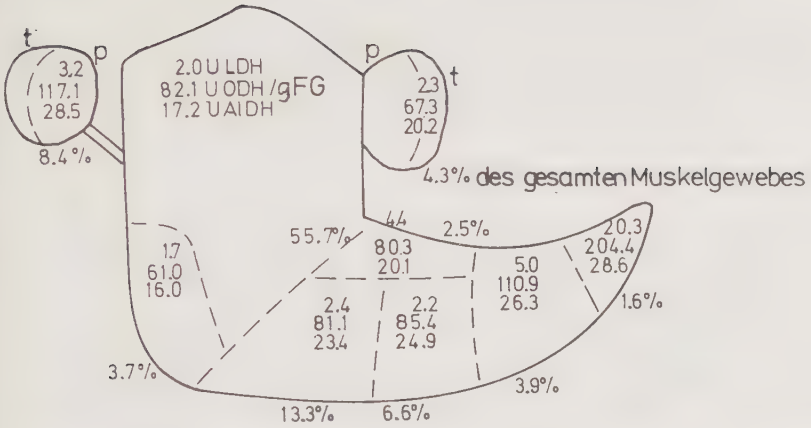

Abb. 4: Verteilung der Aktivitäten der LDH, ODH und AlDH in den verschiedenen Partien der muskulösen Körperwand und dem phasischen (p) und tonischen (t) Teil des Schließmuskels. Die Angaben (U/g FG) sind Mittelwerte (n = 5), deren Standardabweichung weniger als 15% betrug.

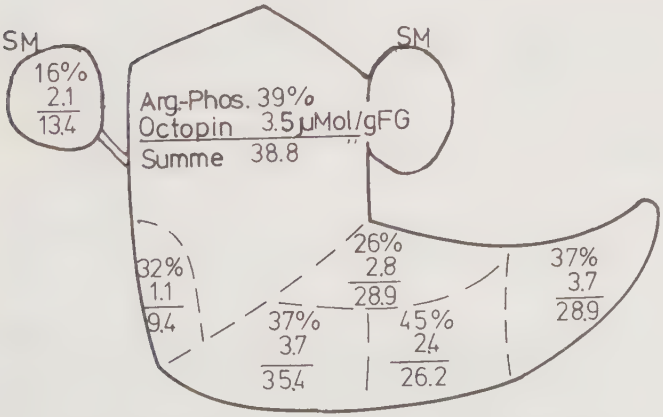

Abb. 5: Der Abbau des Argininphosphats und die Anhäufung von Octopin in verschiedenen Teilen des Weichkörpers und den Schließmuskeln (SM) nach Muskeltätigkeit (25 ± 5 Sprünge, n = 3; SD ≤ 20%). In entsprechenden Ruhetieren betrug der Octopingehalt 0.16 ± 0.06 µMol pro g FG. Der Anteil des Phosphagens an der Summe aller Argininderivate war 69.1% ± 3.5%.

Der phasische und der tonische Teil des Schließmuskels, die nur anhand der Färbung und Konsistenz voneinander getrennt werden konnten, unterscheiden sich lediglich bezüglich der ODH-Aktivität, die im phasischen Teil doppelt so hoch ist.

Beim Vergleich der Aktivitäten der AlDH mit denen der StDH stellte sich heraus, daß letztere unter den gewählten Meßbedingungen immer ca. 90% der AlDH-Aktivität betrugen. Daher ist die Aktivität der StDH in Abb. 4 nicht gesondert aufgeführt worden.

1. Veränderungen der Metabolitkonzentrationen

Entsprechend der Aufteilung des Weichkörpers zur Messung der Enzymaktivitäten wurden bei 3 Muscheln in verschiedenen Teilen des muskulösen Körpers die Konzentrationen von Arginin, Argininphosphat und Octopin nach 25 ± 5 Sprüngen gemessen (Abb. 5). Sowohl die Summe der argininhaltigen Verbindungen, als auch der Abbaugrad des Argininphosphats und die Akkumulation von Octopin waren in allen Körperregionen sehr ähnlich. Nur die irisierende "Ecke" des Fußes und die Schließmuskeln enthielten weniger als die Hälfte der Konzentrationen dieser Metabolite, die in den übrigen muskulösen Regionen festgestellt wurden.

Aus Abb. 6 und Abb. 7 kann man entnehmen, wie sich der Gehalt an Arginin, Argininphosphat und Octopin im Fußmuskel bzw. im gesamten Weichkörper bei zunehmender Muskelarbeit, für die die zunehmende Zahl an Sprüngen als Maßstab genommen wurde, verändert. Ebenso ist der "energy charge" angegeben, der aus den Konzentrationen der Adenylate errechnet wurde. Die Summe der Adenylate (ATP + ADP + AMP) und die der argininhaltigen Verbindungen änderte sich mit zunehmender Muskeltätigkeit weder im Fuß (6.00 ± 0.32 bzw. 31.74 ± 3.12 µMol/g FG, n = 21) noch im gesamten Weichkörper (5.01 ± 0.42 bzw. 24.90 ± 2.38 µMol/g FG, n = 16).

Der Wert des "energy charge" wird mit zunehmender Muskeltätigkeit niedriger, bleibt aber im Bereich von 0.90 bis 0.80 (Regressionskoeffizient r = 0.72 bzw. 0.70).

Der Zusammenhang zwischen der Freisetzung von Arginin, der Bildung von Octopin und der Anzahl der Fluchtbewegungen ist augenscheinlich linear, das gilt ebenso für den Argininphosphat-Abbau, wenn auch in diesem Falle mit anderem Vorzeichen (Abb. 6 und 7). Die Korrelationskoeffizienten für die dazugehörigen

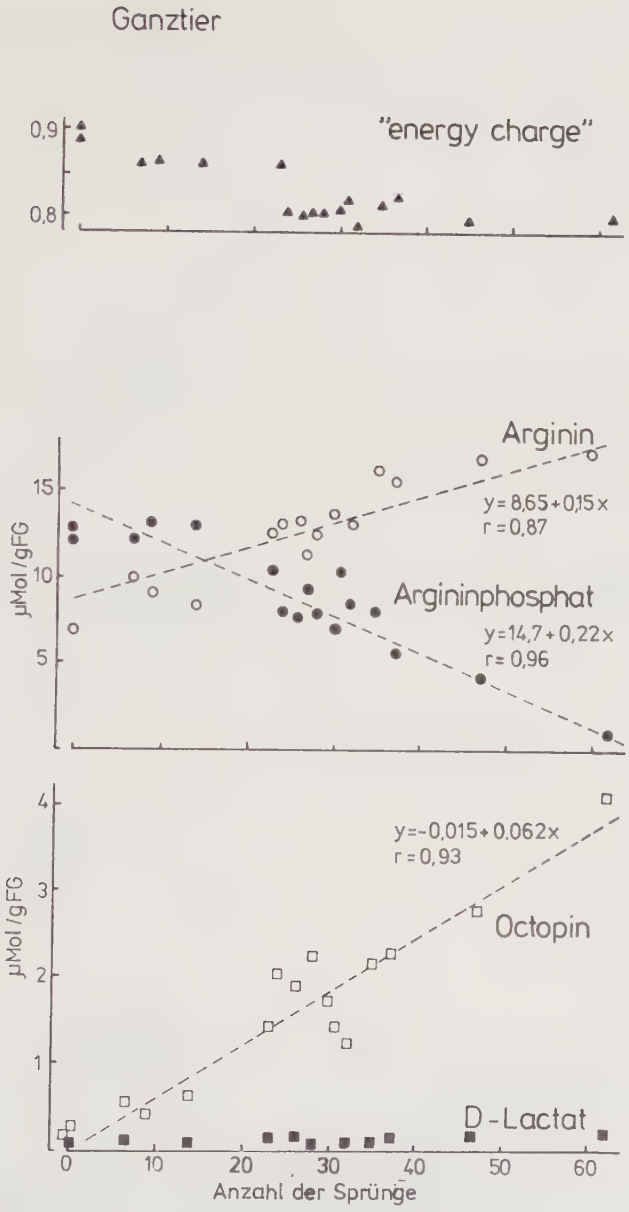

Abb. 6: Gehalt von Argininphosphat, Arginin, Octopin und D-Lactat im gesamten Weichkörper bei zunehmender Anzahl von Fluchtbewegungen (Sprünge). Aus den Einzelwerten wurden Regressionsgeraden y = mx + b sowie der Regressionskoeffizient r berechnet.

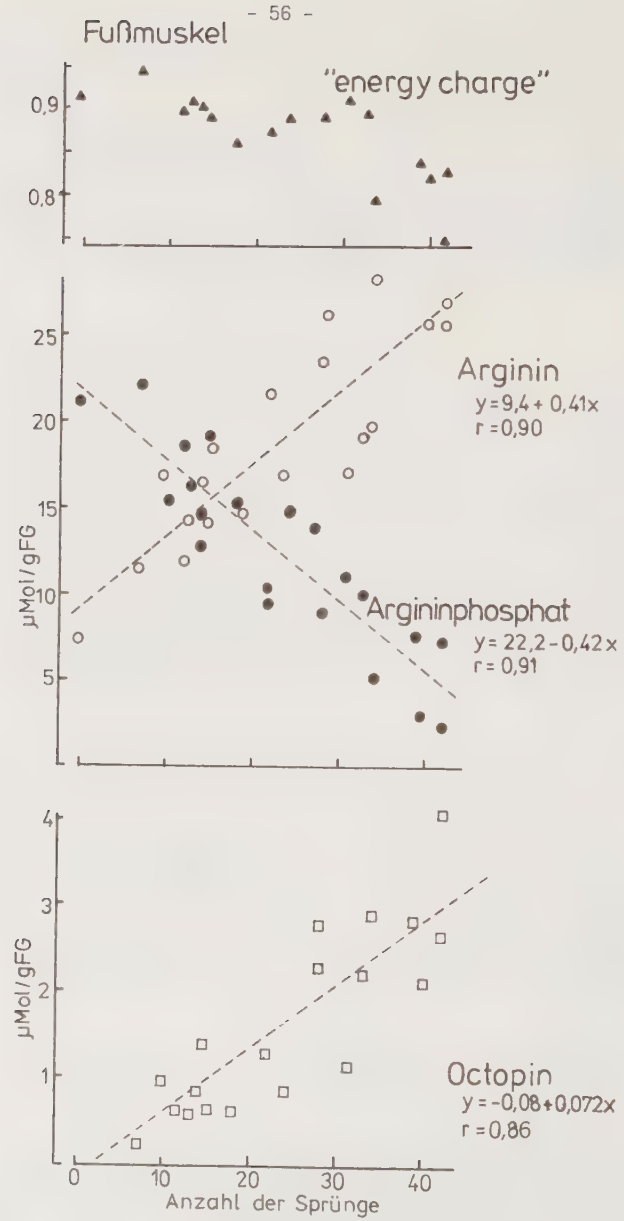

Abb. 7: Auswirkung zunehmender Muskeltätigkeit auf den "energy charge" (obere Figur) und den Gehalt von Argininphosphat, Arginin und Octopin in Fußmuskeln (s. Abb.6).

Regressionsgeraden liegen im Bereich von 0.86 bis 0.96, d.h. sie drücken eine sehr "enge" Beziehung aus.

Vergleicht man nun die Ergebnisse für den Fuß (Abb. 7) mit denen für das ganze Tier (Abb. 6), so ist die Bildung von Octopin für jeden einzelnen Sprung quantitativ sehr ähnlich (0.072 zu 0.062 µMol Octopin/Sprung), und setzt jeweils bei ca. 5 Sprüngen ein.

Die Kontrollwerte des Argininphosphats waren im Fuß fast doppelt so hoch wie im Weichkörper; weiterhin war die Abbaurate des Phosphagens während der Muskeltätigkeit im Fuß nahezu doppelt so hoch (0.42 zu 0.22 µMol Argininphosphat/ Sprung, Abb. 7).

Aus Tabelle 9C ist zu ersehen, daß sich bei Muskeltätigkeit im gesamten Weichkörper sehr wenig D-Lactat bildet. Ebenso konnte keine Bildung von Alanopin oder Strombin festgestellt werden (ohne Tabelle). Auffällig ist der Abbau von Aspartat bei funktioneller Anaerobiose, dem aber ein Fehlen der Alaninbildung und eine nur minimale, wenn auch signifikante, Bildung von Succinat gegenüberstehen. Die Erhöhung des G-6-P-Gehalts weist auf die Aktivierung der Glykogenphosphorylase hin.

Die entsprechenden Veränderungen in den Metabolitkonzentrationen kann man auch dann beobachten, wenn die Muskeltätigkeit nach 6 Std. anaerober Vorinkubation ausgelöst wird. Die Argininphosphatreserven werden durch die Muskeltätigkeit vermindert, und es erfolgt eine Octopinbildung, die der aerob gehaltener Tiere vergleichbar ist. Eine weitere Erhöhung der D-Lactatmenge, die während der vorangegangenen biotopbedingten Anaerobiose gebildet wurde, ist bei Muskeltätigkeit nicht festzustellen, was auch für den Alaningehalt gilt. Die Konzentration des Succinats erscheint dagegen erhöht, was mit den Werten, die bei den Muscheln gemessen wurden, die unter aeroben Bedingungen gesprungen waren, vergleichbar ist, obwohl kein weiterer Abbau des Aspartats beobachtet wurde.

2. Energieausbeute des anaeroben Stoffwechsels

Die Steigungen der Regressionsgeraden in Abb. 6 und 7 geben die Abnahme des Argininphosphats bzw. die Zunahme von Octopin in µMol pro Sprung an. Aus diesen Angaben läßt sich errechnen, wieviel µMol ATP durch den anaeroben Stoffwechsel pro Sprung bereitgestellt wurden. Dabei wird zugrunde gelegt, daß 1 µMol Argininphosphat ein µMol ATP regeneriert und daß die Bildung von einem µMol Octopin 1.5 µMol ATP liefert. Die vergleichsweise geringe Abnahme der

Tabelle 9: Gehalt (µMol/g FG) verschiedener Metabolite des anaeroben Energiestoffwechsels im gesamten Weichkörper von C. tuberculatum nach funktioneller Anaerobiose unter verschiedenen Bedingungen bei 18°C. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung (in Klammern) aus den Messungen an 3 bzw. 4 (#) Muscheln.

A. Adenylate, die Summe der Adenylate und der berechnete "energy charge" (e.c.)

Bedingungen	ATP	ADP	AMP	Summe	"e.c."
aerobe Kontrolle	2.78 (0.42)	0.58 (0.07)	0.13 (0.04)	3.49 (0.51)	0.88 (0.01)
25 Sprünge´	2.82 (0.13)	0.63 (0.07)	0.14 (0.02)	3.59 (0.04)	0.87 (0.01)
6 Std. Anaerobiose#	2.72 (0.48)	0.73 (0.09)	0.17 (0.03)	3.62 (0.53)	0.85 (0.02)
6 Std. Anaerobiose# + 26 Sprünge"	2.38 (0.41)	0.84 (0.04)	0.21 (0.06)	3.43 (0.32)	0.81 (0.04)

B. Arginin, Argininphosphat und Octopin, sowie die Summe dieser Metabolite und der Anteil des Argininphosphats daran

Bedingungen	Arg	ArgP	% ArgP der Summe	Octopin	Summe
aerobe Kontrolle	5.21 (0.27)	8.97 (0.83)	62 (2)	0.22 (0.04)	14.42 (1.07)
25 Sprünge	7.79* (1.35)	6.47* (0.76)	43 (2)	1.19* (0.56)	15.46 (1.99)
6 Std. Anaerobiose#	6.38 (1.83)	10.00 (2.45)	60 (9)	0.28 (0.06)	16.66 (2.14)
6 Std. Anaerobiose# + 26 Sprünge	9.91* (0.71)	5.48* (1.21)	33 (6)	1.14* (0.24)	16.53 (1.33)

Fortsetzung Tab. 9 auf der nächsten Seite

C. Substrate und Endprodukte des anaeroben Kohlenhydratstoffwechsels

Bedingungen	Glucose-6-P	D-Lactat	Alanin	Aspartat	Succinat
aerobe Kontrolle	0.34 (0.06)	0.08 (0.01)	2.26 (0.69)	4.20 (0.13)	0.17 (0.04)
25 Sprünge	0.84* (0.19)	0.27* (0.09)	1.92 (0.25)	1.77* (0.16)	0.35* (0.10)
6 Std. Anaerobiose#	0.59 (0.09)	1.34 (0.12)	3.61 (0.81)	0.97 (0.36)	1.07 (0.33)
6 Std. Anaerobiose# + 26 Sprünge	0.91 (0.41)	1.21 (0.19)	3.10 (0.68)	1.01 (0.13)	1.27 (0.31)

* Signifikanter Unterschied ($p>0.05$) zum entsprechenden Kontrollwert
' 25.3 ± 5.5 Sprünge in 87 ± 31 Sekunden
" 26.5 ± 6.8 Sprünge in 101 ± 46 Sekunden

Tabelle 10: Berechnung der Konzentrationsänderungen (Δ µMol/g FG) des ATP, Argininphosphats und der Endprodukte bei funktioneller Anaerobiose unter aeroben Bedingungen sowie nach anaerober Inkubation. Es wurden die Werten in Tabelle 9 verwendet. In Klammern stehen die daraus errechneten ATP-Äquivalente (µMol ATP/g FG).

Bedingungen	ATP (x1.0)	ArgP (x1.0)	Octopin (x1.5)	D-Lactat (x1.5)	Succinat (x1.0)
25 Sprünge	0.04 (-0.04)	-2.50 (2.50)	0.97 (1.45)	0.19 (0.29)	0.18 (0.18)
6 Std. Anaerobiose + 26 Sprünge	-0.34 (0.34)	-4.52 (4.52)	0.86 (1.29)	-0.13 (-)	0.20 (0.20)

Tabelle 11: Gegenüberstellung der ATP-Äquivalente aus ATP, Argininphosphat, sowie aus den Endprodukten der Glykolyse und der Succinatbildung, die während funktioneller Anaerobiose gebildet wurden. Ebenso wurde der ATP-Verbrauch pro Sprung und die Verbrauchsrate pro Minute Muskeltätigkeit ermittelt: µMol ATP/g FG/Sprung bzw. µMol ATP/g FG/ Minute Muskeltätigkeit.

A. Energieverbrauch in Fußmuskel und Ganztier unter aeroben Bedingungen

	ATP-Verbrauch$ (µMol ATP/g FG/Sprung)			ATP-Verbrauchsrate
	Phosphagen	Glykolyse	total	(µMol ATP/g FG/ Min.)
Fuß	0.42 (83%)#	0.108 (17%)	0.528	12.85´
Ganztier	0.22 (64%)	0.093 (36%)	0.313	6.85"

$ errechnet aus den Gleichungen der Regressionsgeraden in Abb. 6 und 7.
´ Sprungfrequenz f = 24.34 ± 12.19 Sprünge pro Minute
" f = 21.90 ± 11.91 Sprünge pro Minute

B) Vergleich des ATP-Verbrauchs unter aeroben und anaeroben Bedingungen

	ATP-Äquivalente$ (µMol/g FG) aus				ATP-Verbrauch
Bedingungen	Phosphagenen	Glykolyse	Succinat	total	(µMol ATP/g FG/Sprung)
25 Sprünge	2.46 (56%)	1.73 (40%)	0.18 (4%)	4.38	0.175
6 Std. Anaerobiose + 26 Sprünge	4.86 (77%)	1.29 (20%)	0.20 (3%)	6.53	0.237

$ errechnet aus den Werten in Tabelle 10
# prozentualer Anteil am gesamten ATP-Ertrag

ATP-Konzentrationen bleibt bei dieser Rechnung unberücksichtigt.
Pro Gramm Frischgewicht (FG) und Sprung werden im Fuß 0.528 µMol ATP verbraucht, die zu 83% durch den anaeroben Abbau der Phosphagene bereitgestellt werden (Tabelle 11A).
Auf den gesamten Weichkörper bezogen, werden 0.313 µMol ATP pro g FG und Sprung durch den anaeroben Stoffwechsel gebildet, wobei 64% davon aus den Phosphagenen stammen.
Rechnet man trotz einer Standardabweichung von ca. 50% mit einer durchschnittlichen Sprungfrequenz der Muscheln von ca. 23 Sprüngen pro Minute, so erhält man eine ATP-Verbrauchsrate von 12.85 bzw. 6.85 µMol ATP/g FG/ Minute Muskeltätigkeit für den Fuß bzw. den gesamten Weichkörper.
Der Energieertrag des anaeroben Stoffwechsels bei funktioneller Anaerobiose nach aerober bzw. sechsstündiger anaerober Vorinkubation wurde aus den entsprechenden Veränderungen der Metabolitkonzentrationen in Tabelle 10 errechnet.
Bei dieser Versuchsreihe bei 18°C ist die anaerobe ATP-Produktion pro Sprung unter aeroben Bedingungen im gesamten Weichkörper deutlich geringer als bei 20°C (Tabelle 11A bzw. 11B), nämlich 0.175 statt 0.313 µMol ATP/g FG/Sprung. Dabei beträgt die Abbaurate des Argininphosphats nur 0.1 µMol/g FG/Sprung (s. Tabelle 10) und demzufolge der Anteil der Energiebereitstellung daraus nur 56%.
Nach anaerober Vorinkubation liegt der ATP-Verbrauch pro Sprung bei 0.237 µMol/g FG, d.h. sogar etwas höher als unter den vergleichbaren aeroben Bedingungen. Auffallend hoch ist unter diesen Bedingungen der Anteil der Phosphagene von 77% an der gesamten anaeroben ATP-Produktion. Der absolute ATP-Ertrag aus der Glykolyse ist bei vergleichbarer Sprungzahl von 1.73 auf 1.29 µMol ATP/g FG zurückgegangen (Tabelle 11B).

IV. Diskussion

Reizt man die Herzmuschel C. tuberculatum mit Seestern-Extrakt, so reagiert sie mit einer Serie von Fluchtbewegungen, bei deren Ausführung sie sich mit dem Fuß vom Untergrund abschnellt. Diese Bewegung kann ca. 30mal innerhalb von 2 Minuten beobachtet werden.
Die genaue Betrachtung des Bewegungsablaufs (s. Teil C, Abschnitt I) hatte nun zu dem Schluß geführt, daß bei C. tuberculatum nicht nur der Fuß, sondern

der ganze Körper an der Kraftentwicklung für die Sprungbewegung beteiligt ist. Dies wurde durch die vorliegenden Untersuchungen bestätigt.
Schon die feste Beschaffenheit kennzeichnet die Körperwand des Eingeweidesackes als Muskelgewebe. C. tuberculatum hebt zwar durch kraftvolles Strecken des hinausgebogenen Fußes vom Untergrund ab, doch ist die Muskulatur des gesamten Körpers an dieser Kontraktion beteiligt. Sie zeichnet auch für die Erzeugung und die Aufrechterhaltung des notwendigen Haemolymphdruckes verantwortlich, um den Fuß auszustrecken und diesem die für das Abstoßen erforderliche Steifheit zu verleihen.
Die Messungen der Aktivitäten der pyruvatreduzierenden Dehydrogenasen weisen aus, daß diese Enzyme in der gesamten Körperwand in ähnlichen Aktivitäten vorhanden sind, wie sie auch in Fuß- und Schließmuskel vorgefunden werden.
Die Funktion des beobachteten Gradienten zunehmender LDH-Aktivität zur Spitze des Fußes hin ist z.Z. nicht klar. Man kann allerdings annehmen, daß die LDH eine Aufgabe beim Vorgang des Eingrabens hat, weil gerade dieser Teil des Fußes sehr beweglich ist und von der Muschel zur Untersuchung des Untergrundes verwendet wird, in den sie sich eingraben möchte.
Octopin wird in den verschiedenen Regionen des Weichkörpers in etwa gleichem Ausmaß gebildet wie im Fuß, wo es alleiniges Endprodukt der Glykolyse bei Muskeltätigkeit ist. Wenn man nun berücksichtigt, daß der Weichkörper zu ca. 62% aus Muskelgewebe besteht, so erklärt dieses Phänomen den fast identischen Octopin-Gehalt in Fuß und gesamtem Weichkörper bei vergleichbarer Sprungzahl.
Die gleichmäßige Verteilung des Octopins in allen Teilen von C. tuberculatum macht es sehr unwahrscheinlich, daß das Octopin in andere Gewebe zum Zwecke der Oxidation transportiert wird. Eine organspezifische Verteilung von Octopin-Bildung und -Abbau ist in Muscheln noch nie nachgewiesen worden und wird auch nur für bestimmte Cephalopoden angenommen (siehe Übersichtsartikel von Gäde 1983 und von Gäde und Grieshaber 1986).

1. Die Rolle des Octopins als Endprodukt der anaeroben Glykolyse

Die Analysen der metabolischen Veränderungen bei funktioneller Anaerobiose zeigen deutlich, daß nach mehr als fünf Sprüngen der Energieverbrauch die Kapazitäten der aeroben Energieproduktion übersteigt und infolgedessen die Energie für weitere Sprünge durch den Abbau von Argininphosphat und die anaerobe Umsetzung von Glykogen zu Octopin bereitgestellt werden muß (Abb. 6 und 7). Die Messung der Konzentrationen der übrigen Metabolite (Tabelle 9C), die Endprodukte

des anaeroben Stoffwechsels von C. tuberculatum sein können, ergab, daß wie im Fuß (Gäde 1980c) auch im übrigen Weichkörper weder Alanin, Alanopin oder Strombin und nur unbedeutende Mengen an Succinat und D-Lactat während funktioneller Anaerobiose gebildet werden.
Der anaerobe Stoffwechsel reicht aus, um die ATP-Konzentration auf dem Niveau der Ruhetiere zu halten, so daß nur ein geringfügiges Absinken des "energy charge" zu beobachten ist (Abb. 6 und 7).
Im gesamten Weichkörper trägt die Glykolyse 36% zum erhöhten Energiebedarf bei Muskeltätigkeit bei, im Fußmuskel dagegen nur 17% (s. auch Gäde 1980c), obwohl die absolute Octopin-Produktion pro Sprung im Fuß höher ist. Es besteht ein enger Zusamenhang zwischen den vorhandenen Argininphosphat-Reserven und der dazugehörigen Verbrauchsrate des Phosphagens. Die Bildung des Octopins verläuft in C. tuberculatum ebenso wie der Argininphosphat-Abbau proportional zur Anzahl der ausgeführten Sprünge. Die Bildungsrate ist aber unabhängig von der Menge des freien Arginins, da sich diese in Fuß und Ganztier sehr ähnelt, obwohl im Fuß eine deutlich größere Zunahme an Arginin zu beobachten ist.
Die für C. tuberculatum charakteristische gleichmäßige Bildungsrate von Octopin bei zunehmender Muskeltätigkeit unterscheidet sich erheblich von der Situation in der Kammuschel Argopecten irradians concentricus (Chih und Ellington 1983) und der Schnecke Nassa mutabilis (Gäde et al. 1984). Bei diesen Arten nimmt der Anteil an der Energieproduktion, den die Octopin-Bildung bei fortdauernder Muskeltätigkeit leistet, von ca. 30% auf über 70% zu. Der Grund ist die Erschöpfung der Phosphagenreserven. In anderen Muscheln wie z.B. bei Pecten maximus (Gäde et al. 1978) ist die mengenmäßig bedeutendste Periode der Octopin-Bildung zeitlich vom Argininphosphat-Abbau getrennt und findet in der Erholungsphase nach der Muskeltätigkeit statt.

Um eine Antwort auf die Frage zu finden, ob eine Muskeltätigkeit bei vorgegebenen anaeroben Bedingungen in den Geweben zu einer Verstärkung der Bildung von D-Lactat und/oder Octopin führt, wurden Muscheln nach sechsstündiger anaerober Vorinkubation zur Ausführung von Fluchtbewegungen veranlaßt (Tabelle 9). Obgleich die D-Lactat-Bildung bereits während der anaeroben Inkubation eingesetzt hatte, wurde bei Muskeltätigkeit das Pyruvat zu Octopin umgesetzt, ohne daß eine weitere Zunahme des D-Lactat-Gehalts festzustellen gewesen wäre. Es erfolgt also eine sofortige Umschaltung von der D-Lactat- auf die Octopingärung.
Ähnlich wie bei Muskeltätigkeit unter aeroben äußeren Bedingungen wird hier die

anaerobe Energiebereitstellung hauptsächlich (77%) durch den Abbau von Argininphosphat gewährleistet. Erstaunlicherweise ist der Energiebeitrag durch die Octopin-Bildung (20%) geringer als bei einer Muskeltätigkeit unter aeroben Bedingungen (40%). Dabei erfolgt kein Ausgleich durch die Bildung anderer Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels (Tabelle 9C). In A. irradians concentricus werden z.B. 50% der benötigten Energie durch die Glykolyse (Octopin-Bildung) geliefert, bei Muskeltätigkeit nach vierstündiger Anaerobiose ist sie dagegen zu 72% an der anaeroben Energieproduktion beteiligt (Chih und Ellington 1983), was durch die geringen Phosphagen-Reserven bedingt sein mag, die nach der anaeroben Inkubation bereits zum größten Teil aufgebraucht sind.

2. Der ATP-Verbrauch bei funktioneller Anaerobiose

Der ATP-Verbrauch im Fuß von C. tuberculatum beträgt 0.528 µMol ATP/g FG und Sprung und ist repräsentativ für alle Muskelgewebe, denn die Verbrauchsrate des gesamten Weichkörpers umfaßt ca. 60% der Verbrauchsrate der Muskelgewebe. Diese machen wiederum ca. 62% gesamten Weichkörpers aus. Die Nichtmuskelgewebe leisten also keinerlei Beitrag zur anaeroben Energieproduktion bei funktioneller Anaerobiose. Der ATP-Verbrauch pro Sprung bewegt sich für den gesamten Weichkörper folglich immer im gleichen Rahmen, gleichgültig, ob die Muschel zuvor unter aeroben oder anaeroben äußeren Bedingungen (0.313 bzw. 0.237 µMol ATP/ g FG/ Sprung) gehalten wurde und ob sie bei 20°C oder 17°C gesprungen war. Dieses Ergebnis entspricht der Tatsache, daß der theoretische Energieaufwand für gleiche Fluchtbewegungen unter allen Umständen gleich ist.

3. Die Umsatzrate der Glykolyse bei funktioneller Anaerobiose

Die Möglichkeit, C. tuberculatum nach 6 Std. der biotopbedingten Anaerobiose zur Flucht und damit zur funktionellen Anaerobiose zu veranlassen, erlaubt es, aus den Meßwerten einer Versuchsreihe (Tabellen 9) die Umsatzrate der Glykolyse bei biotopbedingter und funktioneller Anaerobiose zu berechnen. Aus dem Vergleich dieser Umsatzraten kann man dann die Steigerung der Glykolyserate bei Muskeltätigkeit errechnen, ohne daß Daten über den basalen aeroben Glykolyseumsatz benöigt werden.
Aus Tabelle 9C kann man entnehmen, daß in 6 Std. der Anaerobiose bei 18°C aus Pyruvat 1.26 µMol D-Lactat, 1.35 µMol Alanin und 0.06 µMol Octopin/g FG gebildet werden. Dies entspricht einem Abbau von 1.335 µMol Glykosyleinheiten/g

FG in 6 Std. bzw. 3.71 nMol Glykosyleinheiten/g FG und pro Minute Anaerobiosedauer. Bei der Berechnung wird für Succinat eine Bildung aus Aspartat angenommen.
Bei durchschnittlich 26.5 Sprüngen in 101 Sekunden werden 0.86 µMol Octopin/g FG gebildet, die einem Umsatz von 0.43 µMol Glykosyleinheiten pro 101 Sekunden bzw. 258 nMol Glykosyleinheiten/g FG pro Minute Muskeltätigkeit entsprechen. Das bedeutet eine Steigerung der Glykolyserate in den 101 Sekunden der Muskeltätigkeit um den Faktor 69.5. Eine ähnliche Steigerungsrate wurde bei der schwimmenden Kammuschel Placopecten magellanicus (de Zwaan et al. 1980) bestimmt: Die Glykolyserate ist 50- bis 75fach erhöht.

Die Ergebnisse an C. tuberculatum belegen eindeutig, daß die Bildung von Octopin nicht an die Freisetzung von Arginin aus Argininphosphat gekoppelt ist, da diese sowohl bei funktioneller als auch bei biotopbedingter Anaerobiose erfolgt. Diese Tatsache legt den Schluß nahe, daß die stark erhöhte Glykolyserate bei funktioneller Anaerobiose die notwendige Voraussetzung für die Bildung von Octopin ist. Es bleibt aber unklar, warum unter diesen Bedingungen keinerlei D-Lactat-Bildung zu beobachten ist. Vielleicht sind die Kapazitäten der LDH (3 - 5 U/g FG, in vitro gemessen unter optimalen Bedingungen, Fig. 4) in vivo zu gering, um in den ca. 2 Minuten der Muskeltätigkeit die Bildung einer meßbaren Menge an D-Lactat zu katalysieren. Daher übernehmen unter diesen Bedingungen die 40mal größeren Aktivitäten der ODH die Rolle der terminalen Dehydrogenase der Glykolyse. Die hohen Aktivitäten der ODH in Relation zu den geringen der LDH sind dafür verantwortlich, daß Octopin während des verstärkten Glykolyseumsatzes gebildet wird. Diese Hypothese wird durch unsere Untersuchungen an der gemeinen Herzmuschel C. edule unterstützt. Die beiden Enzyme weisen im Fußmuskel die gleichen maximalen Aktivitäten (ca. 15 U/g FG, Gäde und Zebe 1973) auf. Tatsächlich wird aber nur die Bildung von D-Lactat als Endprodukt bei anaerober Inkubation sowie nach elektrischen Reizung gemessen, obwohl letztere Manipulation eine 20fache Steigerung der Glykolyserate bewirkt. Die Frage, warum bei biotopbedingter Anaerobiose kein Octopin gebildet wird, bleibt aber weiterhin offen.

Wenn aber der zunehmende Gehalt an Arginin bei funktioneller Anaerobiose nicht die Ursache für die Octopin-Bildung ist, dann wäre der bei C. tuberculatum beobachtete enge Zusammenhang von Octopin-Bildung und Argininphosphat-Abbau nur zufällig. Eine zunehmende Anzahl ausgeführter Sprünge bedeutet jedoch nicht nur

eine Zunahme des Gehalts an freiem Arginin, sondern ebenso eine längere Zeit stark gesteigerten Glykolyseumsatzes mit vermehrter Pyruvat und NADH-Bildung. Die gleichmäßige Bildung von Octopin bei ansteigender Sprungzahl wäre dann nur so zu erklären, daß die Glykolyse schon nach ca. 5 Sprüngen vollständig aktiviert ist und mit gleichbleibendem Umsatz weiter abläuft.

D. Der Erholungsstoffwechsel der Herzmuschel C. tuberculatum nach biotopbedingter und funktioneller Anaerobiose: Sauerstoffschuld und metabolische Veränderung

I. Die Bedeutung der Rückkehr zu den stoffwechselphysiologischen Bedingungen vor der Anaerobiose

Die Stoffwechselwege, die bei Muscheln am anaeroben Energiestoffwechsel beteiligt sind, wurden in der Vergangenheit bereits sehr intensiv untersucht (siehe Teil A: Einführung S. 5 ff.). Besonderes Interesse fand dabei auch die Übergangsphase vom aeroben Stoffwechsel zur biotopbedingten Anaerobiose (Ebberink et al. 1979, Meinardus und Gäde 1981). Doch erst in den letzten Jahren schenkte man der Erholungsphase nach Anaerobiose größere Aufmerksamkeit. Man untersuchte die Vorgänge bei der Rückkehr des Organismus zu dem stoffwechselphysiologischen Zustand, der vor der Anaerobiose geherrscht hatte (s. Übersichtsartikel von Ellington 1983).
Eine rasche und vollständige Erholung nach biotopbedingter Anaerobiose ist von überragender Bedeutung für solche Lebewesen, die nur eine begrenzte Toleranz gegenüber hypoxischen oder gar anoxischen Bedingungen besitzen, denn diese Tiere müssen so schnell wie möglich wieder in der Lage sein, eine eventuell eintretende nächste Periode mit nur begrenzt verfügbarem Sauerstoff zu ertragen. Ähnlich verhält es sich bei intensiver Muskeltätigkeit, die notwendig geworden war, um vor einem Feind zu fliehen. Hier muß die darauf folgende Erholungsphase ebenfalls sehr gut genutzt werden, damit das Tier bei einem möglichen zweiten Angriff weitere Fluchtbewegungen ausführen kann (s. Ellington 1983).
Eine Hauprolle spielt deshalb bei der Gewährleistung der raschen und vollständigen Erholung die Steigerung der Sauerstoffaufnahme, die weit über die Aufnahme unter Ruhebedingungen hinaus gehen kann. Dieses Phänomen wird als Sauerstoffschuld bezeichnet. Weiterhin sind in der Anfangsphase der Erholung oft noch spezielle anaerobe Prozesse daran beteiligt, die Energie für die vorrangige Wiederherstellung der Phosphagenreserven liefern. Beispiele für eine solche "anaerobe Erholungsphase" finden sich in der Octopin-Bildung verschiedener Pecten-Arten während der Erholung von Muskeltätigkeit und die Strombin-/Alanopinbildung in Mytilus edulis nach Beendigung einer biotopbedingter Anaerobiose (Zurburg et al. 1982).
Die Ausgangsbedingungen des Erholungsstoffwechsels sind für die beiden verschieden Typen der Anaerobiose sehr unterschiedlich. Bei biotopbedingter

Anaerobiose geht der Erholung ein langanhaltender, totaler Sauerstoffentzug voran. Alle Sauerstoff verbrauchenden Prozesse im Organismus mußten eingestellt werden und die Energieproduktion wurde gedrosselt. Im Gegensatz dazu ist der anaerobe Stoffwechsel bei funktioneller Anaerobiose nur auf ein Gewebe, den Muskel, beschränkt. Auf Grund einer unzureichenden Sauerstoffversorgung oder zu geringer aerober Stoffwechselkapazität dieses Gewebes, ist dieses nicht fähig, den gesamten erhöhten Energiebedarf aerob zu decken (s. Einführung S. 5). Da die Herzmuschel C. tuberculatum sowohl eine anaerobe Inkubation erträgt, als auch zu intensiver Muskeltätigkeit veranlaßt werden kann, bietet sie sich als geignetes Objekt an, um den Ablauf der Erholung nach den beiden verschieden Typen der Anaerobiose zu vergleichen. In den jeweiligen Erholungsphasen wurde der Sauerstoffverbrauch (Mo_2) gemessen und daraus die Sauerstoffschuld für die jeweilige experimentelle Bedingung errechnet. Ebenso wurde die Veränderung der Konzentrationen verschiedener Metabolite gemessen, die am anaeroben Stoffwechsel beteiligt sind. Es wurde hierbei untersucht, welche anaeroben Endprodukte in einer "anaeroben" Erholungsphase gebildet werden und wie die Rückkehr der verschiedenen durch die Anaerobiose veränderten Metabolitkonzentrationen zu den Werten der aeroben Ruhetiere abläuft.

II. Aufbau, Durchführung und Auswertung der Versuche

1. Versuchstiere

Die für diese Untersuchungen verwendeten Exemplare von C. tuberculatum wurden im April/Mai bzw. September/Oktober der Jahre 1981 bis 1983 gesammelt. Entsprechend der Wassertemperatur des Golfs wurden die Muscheln vor Durchführung der Experimente mindestens drei Tage lang in gut belüftetem Seewasser bei 16 bis 22°C gehältert.

2. Enzyme, Cosubstrate und Chemikalien

Es wurden Enzyme und Substanzen gleicher Herkunft verwendet, wie sie bereits in Teil B, Abschnitt II, 2 beschrieben worden sind.
Die Herstellung des verwendeten Seestern-Extraktes wurde in Teil C, Abschnitt II, 2 ausführlich dargestellt.

3. Versuchsaufbau

a) Erholung nach biotopbedingter Anaerobiose

Von insgesamt 60 Muscheln (3.6 ± 0.6 cm Schalenlänge) wurden je 10 Tiere in eine Waschflasche mit 2 Litern Seewasser (22.5 ± 0.5°C) gelegt. Der Sauerstoffpartialdruck des Seewassers war vorher durch Begasung mit Stickstoff auf Null gebracht worden und wurde im Laufe des Versuchs durch einen konstanten Stickstoffstrom auf diesem Wert gehalten. Für die Bestimmung der Metabolite wurden einmal 5 Muscheln nach 15 Std. der Anaerobiose zur Aufarbeitung aus dem Inkubationsgefäß entnommen. Die dienten als "anaerobe" Vergleichsgruppe (0 Std. Erholung). Die verbleibenden Muscheln wurden in das gut belüftete Seewasser eines Hälterungsbeckens (250 l) gesetzt. Nach 1, 3, 6 bzw. 12 Std. der Erholung wurden jeweils 5 Tiere dem Becken entnommen. Als "aerobe Kontrollgruppe" wurden 5 Muscheln ohne anaerobe Inkubation unmittelbar aus den Hälterungsbecken entnommen.
Zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs während der Erholung wurden jeweils einzelne Muscheln nach 2, 6, 10 bzw. 15 Std. anaerober Inkubation aus den Waschflaschen genommen und in die Respirometerkammer (s.u.) eingesetzt.

b) Erholung nach funktioneller Anaerobiose

Muscheln wurden einzeln in ein großes, flaches Becken (1 x 2 m) gelegt, das bis zu einer Höhe von 7 cm mit gut belüftetem bzw. hypoxischem (Po_2 = 50 Torr) Seewasser gefüllt war und dessen Boden eine dünne Sandschicht bedeckte. Durch das Auftragen von Seesternextrakt auf den Mantelrand der Muschel wurden diese zur Ausführung von 25 bis 30 Fluchtbewegungen stimuliert (s. Teil C, Abschnitt 3).

aa) Erholung in aerobem Wasser

In einer Versuchsreihe (bei 22°C) wurden die Weichkörper einzelner Muscheln gleich nach Beendigung der Muskeltätigkeit bzw. nach 5, 10 oder 15 Minuten der Erholung in aerobem Seewasser für die Metabolitbestimmungen aufgearbeitet.

bb) Erholung in anaerobem Seewasser

In einer weiteren Versuchsreihe (bei 18°C) wurden Muscheln nach Muskeltätigkeit bzw. nach Ablauf einer darauf folgenden Ruhephase von 15 oder 30 Minuten in 2 l sauerstofffreien Seewassers analysiert.

cc) Erholung in anaerobem Seewasser nach anaerober Vorinkubation und anschließender Muskeltätigkeit in hypoxischem Seewasser

Zusätzlich wurden Muscheln, die zuvor 6 Std. in sauerstofffreiem Seewasser inkubiert worden waren, dazu veranlaßt, in hypoxischem Seewasser (16°C, Po_2 = 50 Torr) ihre Fluchtbewegungen auszuführen (siehe Teil C, Abschnitt II, 3c). Anschließend konnten die Muscheln sich 30 bzw. 45 Minuten in anaerobem Seewasser "erholen" (s.o.).

Zur Messung des Sauerstoffverbrauchs direkt nach der Muskeltätigkeit wurden einzelne Muscheln in die Respirometerkammer gesetzt, nachdem sie eine bestimmte Anzahl von Sprüngen in gut belüftetem Seewasser ausgeführt hatten.

4. Entnahme und Lagerung der Gewebe, Bereitung der Perchlorsäureextrakte und Bestimmung der Metabolite

Die Weiterbehandlung der Gewebe nach Versuchsende, die Extraktion der Gewebe mit Perchlorsäure und die Bestimmung der Metabolite erfolgte genau nach den in Teil B, Abschnitt II, 5 und 7 angegebenen Verfahren.

5. Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs

Zur Messung des Sauerstoffverbrauchs einzelner Muscheln wurden diese in eine abgedunkelte, geschlossene Kammer (Gesamtvolumen 485 ml) gesetzt. Die Abnahme des Sauerstoffpartialdrucks (Po_2) des Seewassers in der Kammer wurde über eine angeschlossene Sauerstoff-Elektrode (E 5046, Fa. Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) kontinuierlich mit einem Flachbettschreiber (Servogor 120, BBC, Goerz-Metrawatt) registriert. Falls der Sauerstoffpartialdruck in der Kammer unter 85% Sauerstoffsättigung sank, wurde durch langsamen Wasseraustausch wieder 100% Sättigung eingestellt. Die Elektrode wurde mit luftgesättigtem Seewasser auf 100% und mit 7%iger Na_2SO_3-Lösung auf 0% Sauerstoffsättigung

geeicht.
Das Wasser in der Kammer wurde mit einem Magnetrührer ständig durchmischt. Die jeweilige Wassertemperatur wurde während einer Messung konstant gehalten (0.1°C Abweichung), indem die Meßkammer in einem Becken mit 100 l Seewasser plaziert wurde, welches wiederum an den Vorratsbehälter des zirkulierenden Wassers der Aquarien der Stazione Zoologica di Napoli angeschlossen war.
Um den Sauerstoffverbrauch einzelner Muscheln bei abnehmendem äußeren Sauerstoffpartialdruck zu bestimmen, wurde dessen Abnahme in der Respirometerkammer über 10 Std. hinweg bis zum vollständigen Verbrauch des Sauerstoffs gemessen.

6. Berechnung des Sauerstoffverbrauchs

Die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs (µMol O_2/g FG und Std.) erfolgte nach der Formel

$$Mo_2 = \frac{a \cdot Po_2 \cdot P_{max} \cdot V_{Box}}{t \cdot P_{760} \cdot \text{Tiergewicht}} \quad .$$

Mo_2 : Sauerstoffverbrauch in µMol O_2/g FG und Stunde
a : Löslichkeit des O_2 in µMol/L bei STDP
Po_2: Änderung des Sauerstoffpartialdrucks in %
P_{max}: Maximaler Sauerstoffpartialdruck bei den gegebenen Druck- (B) und Temperturverhältnissen: $(P_B - P_{H20}) \cdot 0.2091$
P_{760}: Maximaler Sauerstoffpartialdruck bei STDP
V_{Box}: Kammervolumen - Tiervolumen
t : Zeit (Std.)

7. Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks in der Hämolymphe

Aus dem Hämolymphsinus des Fußes von C. tuberculatum wurden 0.1 bis 0.3 ml Flüssigkeit mit einer 1 ml-Spritze entnommen. Da die Hämolymphe eine klare, wasserähnliche Flüssigkeit ist, war es sehr schwierig, Proben ausreichender Größe zu erhalten, die nicht mit Sauerstoff kontaminiert waren. Dieses Problem trat besonders bei anaerob inkubierten Muscheln auf. Daher war der Totraum der Spritze entsprechend der Methode von Fyhn und Costlow (1975) mit Paraffinöl

gefüllt, weil etwa auftretende Luftblasen sofort in dem Paraffinöl eingeschlossen wurden.
Die Hämolymphproben von Ruhetieren, sowie von Tieren nach anaerober Inkubation (6 Std.) und nach Ausführung von ca. 10, 16 bzw. 26 Sprüngen wurden in eine thermostatisierte Meßzelle (D 616, Fa. Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) injiziert, die mit einer Sauerstoff-Elektrode ausgerüstet war (s.o.). Es wurde der Sauerstoffpartialdruck bei der jeweiligen Wassertemperatur (ca. 18°C) der Hälterungsbecken gemessen.

8. Statistische Auswertung der Daten

Die Signifikanz der Konzentrationsänderungen von Metaboliten während funktioneller Anaerobiose wurde durch die Prüfung mit dem "Student´s t-Test" festgestellt. Alle Vergleiche von Mittelwerten wurden auf dem Niveau zweiseitiger 5%iger Ablehnungswahrscheinlichkeit gemacht. Die Signifikanz der metabolischen Veränderungen während der Erholungphase nach anaerober Inkubation wurde mit einer Varianzanalyse überprüft.

III. Ergebnisse

1. Verhalten während und nach anaerober Inkubation und Muskeltätigkeit

Die Muschel C. tuberculatum hält ihre Schalenhälften während der anaeroben Inkubation weit geöffnet und läßt sie auch bei Überführung in gut belüftetes Seewasser offen, so daß ein sofortiger Austausch des Wassers in der Mantelhöhle erfolgen kann. Auch wenn die Muschel nach ca. 30 Fluchtbewegung erschöpft ist, hält sie ihre Schalen weit geöffnet und schließt sie nur, wenn der Mantelrand berührt wird.

2. Sauerstoffverbrauch

Bei den Messungen des Sauerstoffverbrauchs vom September 1983 entsprach die Temperatur von 23°C der, die auch im Herbst 1981 bei den Versuchsreihen der

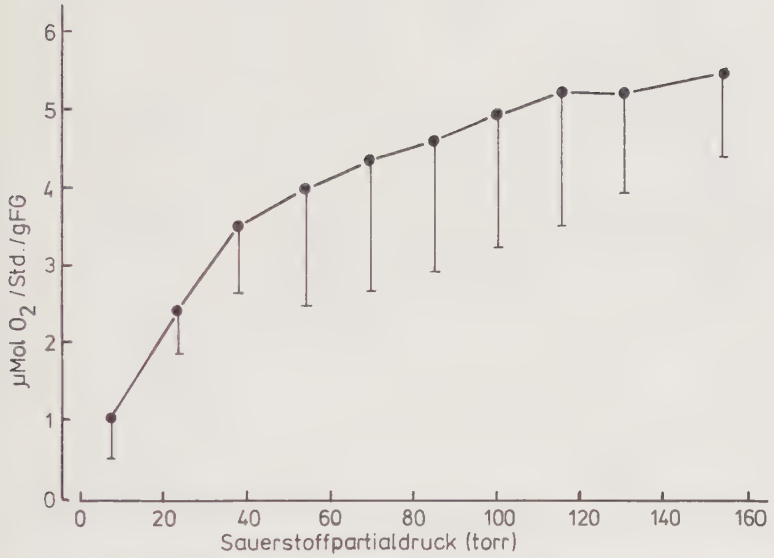

Abb. 8: Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von C. tuberculatum bei 23°C vom Sauerstoffpartialdruck des umgebenden Wassers (n = 5).

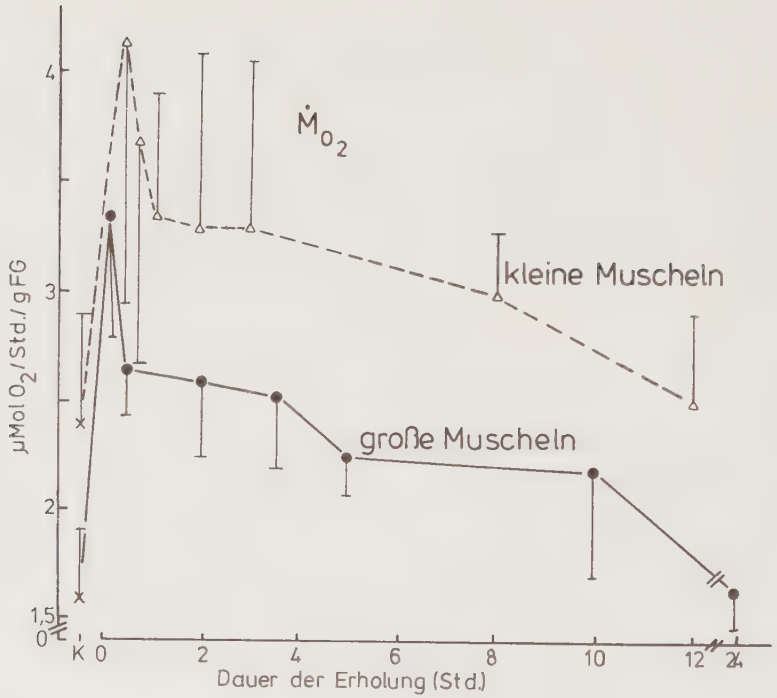

Abb. 9: Sauerstoffverbrauch kleiner (3.8 ± 0.6 g FG, △ , n= 3) und großer Muscheln (9.8 ± 1.5 g FG, ● , n = 3) bei 16°C während der Erholungsphase nach 17 Std. der biotopbedingten Anaerobiose.

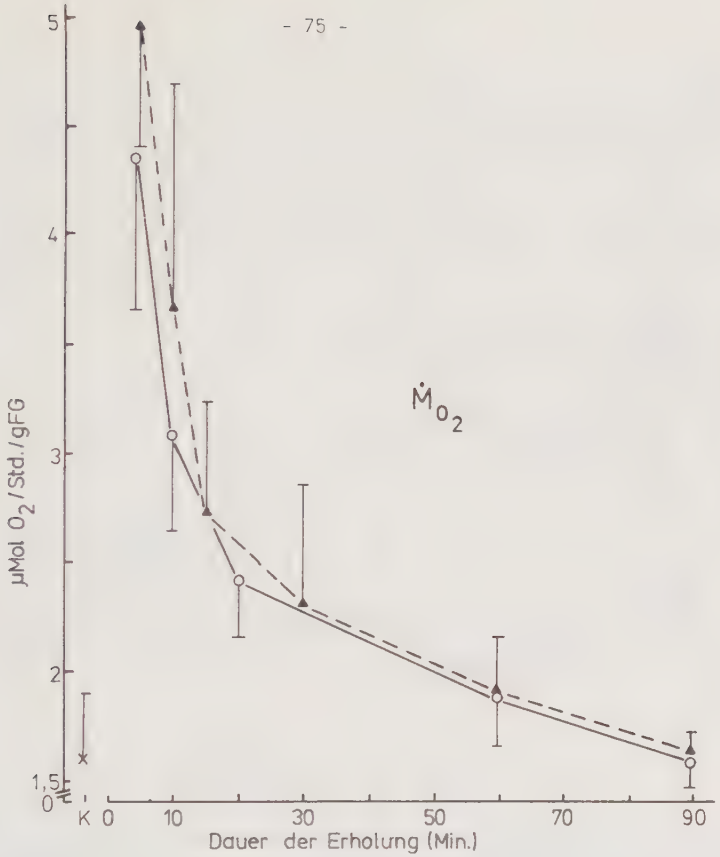

Abb. 10: Sauerstoffverbrauch großer Muscheln (9.8 ± 1.5 g FG) bei 16°C in der Erholungsphase nach Muskeltätigkeit (o : 9.5 ± 1.5 Sprünge; ▲ : 17 ± 2 Sprünge; n = 3).

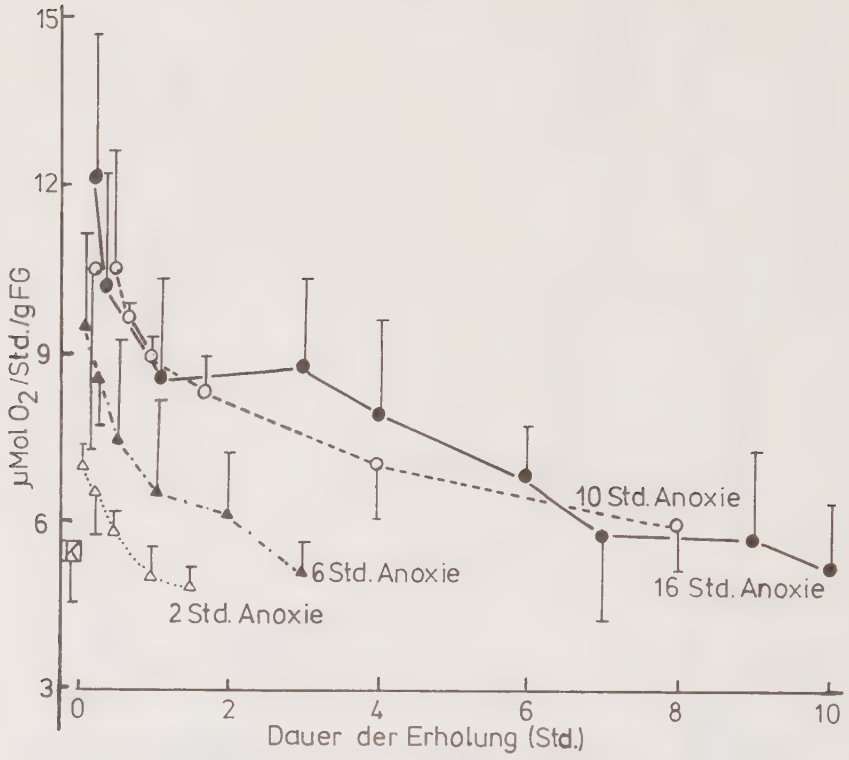

Abb. 11: Der Sauerstoffverbrauch kleiner Herzmuscheln (2.2 ± 0.5 g FG) bei 23°C während der Erholungsphase nach verschiedenen Perioden biotopbedingter Anaerobiose (△ : n = 4; ▲ : 5; o : 3; ● :4).

anaeroben Inkubation geherrscht hatten (s. Teil B, II, 3), außerdem standen genügend viele Muscheln der gewünschten Größe (2.2 ± 0.5 g FG) zur Verfügung, wie sie auch für die Untersuchungen des anaeroben Stoffwechsels verwendet worden waren. Somit ist ein entsprechender Vergleich der Daten aus den Messungen des Sauerstoffverbrauchs mit denjenigen, die für den anaeroben Stoffwechsel erhalten wurden, möglich.
Die Muscheln, die zuvor einige Tage in gut belüftetem Seewasser gehalten worden waren und sich mehrere Stunden in der Meßkammer akklimatisieren konnten, hatten bei 23°C einen Sauerstoffverbrauch von 5.5 ± 1.0 µMol O_2/Std./g FG (n = 7). Damit war dieser etwa doppelt so hoch wie der Sauerstoffverbrauch von Muscheln vergleichbarer Größe bei 16°C, einer Wassertemperatur, wie sie im Frühjahr im Golf von Neapel herrscht.
Der Sauerstoffverbrauch von mittleren und sehr großen Exemplaren (3.8 ± 0.6 g FG bzw. 9.8 ± 1.5 g FG des Weichkörpers) wurde im April 1983 bei 16.0 ± 0.2°C bestimmt. Es stellte sich heraus, daß die großen Muscheln einen geringeren relativen Sauerstoffverbrauch als die mittlerer Größe (1.6 ± 0.3 µMol O_2/Std./g FG, n = 3 bzw. 2.4 ± 0.5 µMol O_2/Std./g FG, n = 8) hatten (siehe Abb. 9).

Um Informationen über die Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme vom äußeren Sauerstoffpartialdruck (Po_2) zu erhalten, wurde bei 23°C der Sauerstoffverbrauch von fünf kleinen Muscheln einzeln bestimmt, die den gesamten Sauerstoffgehalt der verschlossenen Respirationskammer innerhalb von 6 Std. verbraucht hatten und dadurch den Po_2 des Wassers in der Kammer allmählich erniedrigten. Bis zu einem Po_2-Wert von ca. 70 Torr kann die Sauerstoffaufnahme auf dem Niveau von 5.5 bis 4.5 µMol O_2/Std./g FG gehalten werden. Sinkt der Sauerstoffpartialdruck unter 46 Torr, nimmt der Sauerstoffverbrauch fast linear mit dem fallenden Po_2 ab (ca. 1.3 µMol O_2/Std./g FG pro 15 Torr Po_2, Abb. 8).

3. Sauerstoffverbrauch nach biotopbedingter Anaerobiose

Der Sauerstoffverbrauch der Muscheln, die anaerob bei 23°C inkubiert wurden, ist schon 5 Minuten nach dem Einsetzen in gut belüftetes Seewasser maximal erhöht (Abb. 11). Der Grad der Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs steigt mit der Dauer der anaeroben Inkubation auf das 2.3fache des Ruhewertes (nach 16 Std. der Anaerobiose) (Tabelle 12 A). Ebenso nimmt die Dauer des erhöhten

Tabelle 12: Vergleich der Sauerstoffschuld (A) nach verschiedenen Perioden anaerober Inkubation und (B) unterschiedlicher Anzahl von Fluchtbewegung. Zugrunde gelegt wurden die Meßwerte in den Abb. 9 - 12 für Tiere von 3.8 ± 0.6 g FG (kleine) und 9.8 ± 1.5 g (große) bei 16°C, sowie von 2.2 ± 0.5 g FG bei 23°C errechnet.

Physiol. Bedingungen	Verstärkter Sauerstoffverbrauch Grad*	Dauer	O_2-Schuld (µMol O_2/g FG)	O_2-Defizit (µMol O_2/g FG)		Sauerstoffmenge zur Oxidation der anaeroben Endprodukte (µMol O_2/g FG)		die der Energie entsprich (µMol O_2/g FG)	
A. 1. Biotopbedingte Anaerobiose bei 16°C (Std.)									
17 kleine	1.7x	12 h	9.5	41.0	(23%)´	-		-	
17 große	2.1x	15 h	15.7	27.2	(58%)	-		-	
2. Biotopbedingte Anaerobiose bei 23°C									
2	1.4x	1 h	1.1	9.8	(11%)´	1.6#	(68%)"	0.87#	(126%)´"
6	1.9x	2 h	3.7	30.4	(12%)	11.9#	(31%)	2.01	(184%)
10	2.0x	11 h	18.8	60.4	(31%)	18.1#	(104%)	3.09	(609%)
16	2.3x	10 h	21.8	78.1	(28%)	27.1	(80%)	4.53	(481%)
B. 1. Funktionelle Anaerobiose bei 16°C (Anzahl der Sprünge)									
9.0	2.9x	90 Min.	0.8	-		-			
17.2	3.4x	120 Min.	1.0	-		-			
2. Funktionelle Anaerobiose bei 23°C (Anzahl der Sprünge)									
4.3	2.6x	90 Min	2.4	-		0.8#	(300%)	0.2	(1200%)
8.7	2.8x	90 Min	2.7	-		1.7#	(159%)	0.4	(675%)
16.8	3.3x	90 Min	3.3	-		3.2#	(103%)	0.8	(413%)
26.0	3.5x	90 Min	3.8	-		5.2	(67%)	1.1	(345%)

* verglichen mit dem Sauerstoffverbrauch der entsprechenden Ruhetiere
\# errechnet nach den Werten in Tabelle 6
´ Die Sauerstoffschuld wird mit dem theoretischen Sauerstoffdefizit bei angenommem gleichgebliebenem Sauerstoffverbrauch verglichen
" Sauerstoffschuld verglichen mit der Sauerstoffmenge, die für die Oxidation der anaeroben Endprodukte benötigt würde
"´ Sauerstoffschuld verglichen mit der Sauerstoffmenge, die benötigt würde, um den zusätzlichen, anaerob gedeckten Energiebedarf auszugleichen

Tabelle 13: Konzentrationen (µMol/g FG) verschiedener Metabolite des Energiestoffwechsels im gesamten Weichkörper nach verschiedenen Perioden der Erholung in gut belüftetem Seewasser nach 15 Std. experimenteller Anaerobiose (Anoxie) bei 22°C. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung (in Klammern) aus den Messungen an 4 (#) bzw. 5 Muscheln.

A. Die Adenylate, deren Summe und der berechnete "energy charge" ("e.c.")

Dauer der Erholung	ATP	ADP	AMP	Summe	"e.c."
aerobe Kontrolle	4.12 (0.60)	0.81 (0.03)	0.21 (0.12)	5.14 (0.56)	0.88 (0.03)
0 Std. (15 Std. Anoxie)	3.39* (0.37)	0.93* (0.11)	0.34 (0.07)	4.66 (0.37)	0.83* (0.02)
1 Std.	3.73 (0.19)	0.91 (0.10)	0.27 (0.09)	4.91 (0.14)	0.86 (0.03)
3 Std.#	4.11$ (0.51)	0.85 (0.09)	0.22 (0.04)	5.18 (0.46)	0.88$ (0.02)
6 Std.	3.76 (0.77)	0.84 (0.06)	0.23 (0.04)	4.83 (0.72)	0.86$ (0.02)
12 Std.	4.00 (0.36)	0.77 (0.10)	0.19 (0.10)	4.96 (0.30)	0.88$ (0.03)

B. Argininhaltige Metabolite, deren Summe und der prozentuale Anteil des Phosphagens daran

Dauer der Erholung	Arg	ArgP	% ArgP der Summe	Octopin	Summe
aerobe Kontrolle	8.62 (1.47)	11.29 (0.82)	57 (4)	0.30 (0.08)	20.21 (1.78)
0 Std. (15 Std. Anoxie)	14.60* (1.91)	5.74* (2.34)	28 (9)	0.59* (0.10)	20.93 (2.81)
1 Std.	9.93 (1.91)	10.61$ (2.17)	51 (8)	0.35 (0.23)	20.89 (2.30)
3 Std.#	10.52 (2.16)	11.34$ (3.25)	52 (13)	0.27$ (0.13)	22.14 (2.19)
6 Std.	9.41 (1.82)	12.47$ (2.97)	57 (9)	0.24$ (0.04)	22.12 (2.19)
12 Std.	8.60 (1.39)	14.30$ (2.70)	61 (3)	0.15$ (0.18)	23.05 (3.60)

Fortsetzung Tab. 13 auf der nächsten Seite

C. Substrate und Endprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels

Dauer der Erholung	Glucose-6-P	D-Lactat	Alanin	Aspartat	Succinat
aerobe Kontrolle	0.49 (0.12)	0.11 (0.06)	2.24 (0.75)	5.78 (1.18)	0.39 (0.18)
0 Std. (15 Std. Anoxie)	2.07* (0.30)	5.87* (1.51)	6.68* (1.44)	1.37* (0.99)	2.04* (0.18)
1 Std.	1.53* (0.62)	5.91* (1.96)	5.37* (1.03)	2.27* (1.02)	1.07 (0.57)
3 Std.	1.12$ (0.62)	4.50* (0.91)	4.29*$ (0.54)	1.90* (0.84)	0.68 (0.34)
6 Std.	0.53$ (0.22)	3.61 (1.93)	3.92*$ (1.07)	2.25* (1.07)	0.62 (0.14)
12 Std.	0.43$ (0.11)	1.37*$ (0.34)	2.59$ (0.74)	3.03*$ (0.57)	0.46 (0.20)

* Signifikanter Unterschied ($p<0.05$) zum aeroben Kontrollwert
$ Signifikanter Unterschied ($p>0.05$) zum Wert nach 15 Std. Anoxie

Sauerstoffverbrauchs während der Erholungsphase mit der Inkubationsdauer zu; doch kehrte nach Phasen von mehr als 10 Std. der Anaerobiose der Sauerstoffverbrauch stets innerhalb von 10 bis 12 Std. Erholung auf das Niveau des Ruhewertes zurück (Abb. 11). Folglich nimmt auch die Sauerstoffschuld, d.h. die Sauerstoffmenge, die zusätzlich zum "normalen" Verbrauch der Ruhetiere während der Erholungsphase aufgenommen wurde, mit der Dauer der vorhergehenden Anaerobiose zu. Es ist aber keine lineare Abhängigkiet des Sauerstoffschuld von der Anaerobiosedauer gegeben, sondern ein starker Anstieg der Sauerstoffschuld nach mehr als 6 Std. der Anaerobiose festzustellen (Tabelle 12).

Vergleichbare Messungen bei 16°C an mittleren und großen Muscheln nach 17 Std. anaerober Inkubation ergaben, daß der relative maximale Anstieg der Sauerstoffverbrauchs (1.7- bis 2.1facher Ruhewert) zu Beginn der Erholungsphase und die Dauer der Rückkehr des Sauerstoffverbrauchs zum Ruhewert (12 - 15 Std., Abb. 9) dem Schema der Sauerstoffaufnahme bei 23°C entspricht. Die Sauerstoffschuld bei 16°C ist entsprechend dem geringen Sauerstoffverbrauch der Ruhetiere (s.o.) in Tieren vergleichbarer Größe nur halb so hoch wie bei 23°C (Tabelle 12A)

4. Sauerstoffverbrauch nach funktioneller Anaerobiose

Unmittelbar nach Muskeltätigkeit (ca. 4 Sprünge) steigt der Sauerstoffverbrauch von C. tuberculatum (bei 23°C) schon auf das 2.6fache des Ruhewertes und erhöht sich bei 26 Sprüngen sogar auf das 3.5fache, d.h. auf 19.1 µMol O_2/Std./g FG. Die Steigerung des Sauerstoffverbrauchs nimmt also mit der Anzahl der Sprünge zu (Tabelle 12B). Die Rückkehr zum Ruheverbrauch erfolgt jedoch recht einheitlich in exponentieller Abnahme innerhalb von 90 bis 120 Minuten (Abb. 12). Die Beziehung zwischen der Sauerstoffschuld (y) und der Anzahl der Sprünge (x) läßt sich sehr gut durch die Geradengleichung $y = 2.14 + 0.065x$ (Regressionskoeffizient $r = 0.99$) beschreiben. Die Sauerstoffschuld setzt sich demnach aus einem Basalwert von 2.14 µMol O_2/g FG und einem variablen Anteil zusammen, der mit zunehmender Anzahl der Sprünge größer wird (Tabelle 12B).

Die Bestimmungen des Sauerstoffverbrauchs großer Muscheln bei 16°C ergab, daß der Verlauf der Sauerstoffaufnahme auch nach Muskeltätigkeit prinzipiell der gleiche ist, wie er oben für 23°C beschrieben wurde: Der Sauerstoffverbrauch erhöht sich maximal um das 3.4fache des Ruhewertes und kehrt innnerhalb von ca.

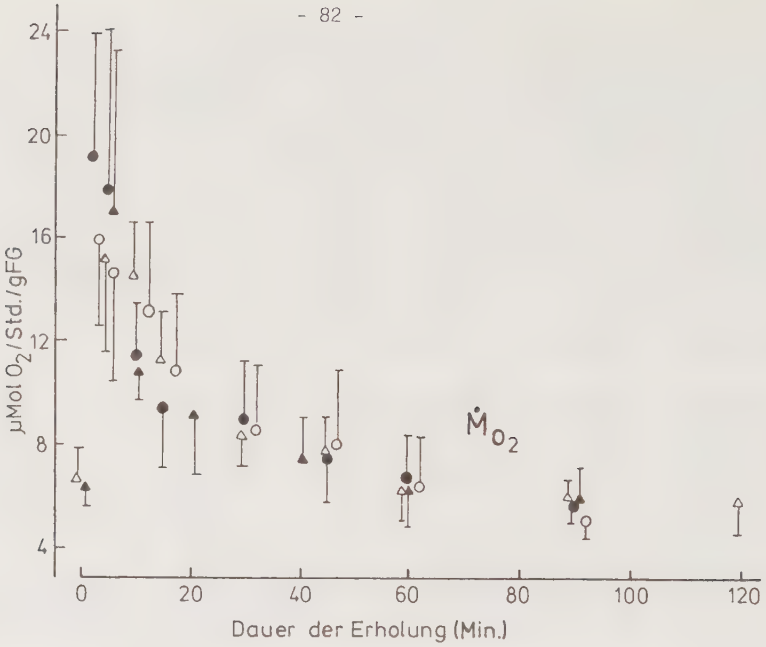

Abb. 12: Der Sauerstoffverbrauch kleiner Muscheln bei 23°C während der Erholungsphase nach funktioneller Anaerobiose (△: 4.3 ± 1.0 Sprünge, n = 4; ○: 8.7 ± 1.4, n = 4; ▲: 16.8 ± 1.9, n = 5; ●: 26 ± 1, n = 5).

90 Minuten zum Ruhewert zurück (Abb. 10). Auch bei dieser Temperatur (16°C) war ein Anstieg der Sauerstoffschuld mit zunehmender Anzahl der Fluchtbewegungen festzustellen, wobei die Sauerstoffschuld ebenfalls einen basalen Anteil beinhaltet, der nicht mit der Zahl der Sprünge korreliert ist.

5. Der Sauerstoffpartialdruck in der Hämolymphe

Anhand des Sauerstoffpartialdrucks in der Hämolymphe kann man ersehen, wieviel Sauerstoff in der Körperflüssigkeit gelöst ist. Wurden Muscheln bei 18°C in gut belüftetem Seewasser gehalten (Po_2 = 155 Torr), so hatte das Wasser in den Mantelhöhlen der Muscheln einen Po_2 von 122.6 ± 5.9 Torr (n = 4), während der durchschnittliche Sauerstoffpartialdruck in der Hämolymphe bei 64.8 ± 7.0 Torr lag.
Nach 6 Stunden Inkubation in sauerstofffreiem Seewasser bei 18°C wurde in der Hämolymphe ein Po_2 von 21.6 ± 12.8 Torr (n = 3) gemessen.
Bei Muskeltätigkeit änderte sich der Sauerstoffpartialdruck der Hämolymphe auch in nahezu völlig erschöpften Muscheln nur um 14%: 68.5 ± 10.5 Torr (n = 6), 64.5 ± 17.4 Torr (n = 4) und 55.5 ± 7.1 Torr (n = 5) nach ca. 10, 16 bzw. 24 Sprüngen.

6. Metabolische Veränderungen während der Erholung nach biotopbedingter Anaerobiose

Die anaerobe Inkubation von C. tuberculatum bei 22°C führte zu einer Verringerung des ATP-Gehalts und demzufolge auch zu einer Abnahme des Wertes des "energy charge". Die Argininphosphatvorräte wurden in dieser Zeit etwa zur Hälfte abgebaut. Die Endprodukte des Glykogen- und Aspartatabbaus waren im wesentlichen D-Lactat, Alanin und etwas Succinat (Tabelle 13, Abb. 13).
Nach Beendigung der Anaerobiose wurden innerhalb der ersten Stunde der Erholung in gut belüftetem Seewasser die ATP- und Argininphosphatreserven bereits zu 90% und nach weiteren zwei Stunden wieder vollständig aufgefüllt (Abb. 13).
Die Konzentrationen der Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels nahmen für Alanin und Succinat schon mit dem Beginn der Erholungsphase ab, der D-Lactatgehalt dagegen erst nach mehr als einer Stunde. Später verringerte sich die Konzentration dieser Metabolite kontinuierlich mit Fortdauer der Erholung. Während die Konzentrationen von Alanin und Succinat innerhalb von 12

Tabelle 14: Veränderungen einiger Metabolitkonzentrationen in C. tuberculatum während funktioneller Anaerobiose und nachfolgender Erholung in gut belüftetem Seewasser bei 23°C. Angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung (in Klammern) von den Messungen an 4 bzw. 5 (#) Muscheln.

A. Konzentrationen (µMol/g FG) der Adenylate, sowie die Summe der Adenylate und der berechnete "energy charge" (e.c.)

Bedingungen	ATP	ADP	AMP	Summe	"e.c."
aerobe Kontrolle#	4.10 (0.60)	0.81 (0.03)	0.21 (0.12)	5.14 (0.56)	0.88 (0.03)
27 Sprünge´#	3.51 (0.53)	1.32* (0.14)	0.35 (0.09)	5.18 (0.75)	0.81* (0.01)
23 Sprünge" + 5 Min. Erholung	3.87 (0.31)	0.97* (0.10)	0.18 (0.06)	5.02 (0.30)	0.87 (0.02)
26 Sprünge "´ + 10 Min. Erholung	3.50 (0.27)	0.86 (0.07)	0.14 (0.04)	4.50 (0.29)	0.87 (0.01)
29 Sprünge "" + 20 Min. Erholung	3.80 (0.50)	0.79 (0.06)	0.13 (0.05)	4.72 (0.57)	0.89 (0.01)

B. Konzentrationen (µMol/g FG) von Arginin, Argininphosphat und Octopin, sowie die Summe dieser Metabolite und der prozentuale Anteil des Argininphosphats daran

Bedingungen	Arg	ArgP	% ArgP der Summe	Octopin	Summe
aerobe Kontrolle#	8.62 (1.47)	11.92 (0.82)	57 (4)	0.30 (0.08)	20.21 (1.78)
27 Sprünge´#	11.32* (1.35)	6.57* (0.76)	33 (2)	2.03* (0.56)	19.92 (1.99)
23 Sprünge" + 5 Min. Erholung	8.79 (0.80)	8.08* (1.32)	46 (3)	0.81* (0.44)	17.68 (2.27)
26 Sprünge"´ + 10 Min. Erholung	8.70 (1.27)	9.35* (1.65)	51 (3)	0.55* (0.13)	18.60 (2.89)
29 Sprünge "" + 20 Min. Erholung	6.00 (0.87)	10.88 (1.97)	64 (4)	0.25 (0.05)	17.13 (2.55)

Fortsetzung Tab. 14 auf der nächsten Seite

C. Konzentrationen (µMol/g FG) verschiedener Metabolite des anaeroben Energiestoffwechsels

Bedingungen	Glucose-6-P	D-Lactat	Alanin	Aspartat	Succinat
aerobe Kontrolle#	0.49 (0.12)	0.11 (0.06)	2.24 (0.75)	5.78 (1.18)	0.39 (0.18)
27 Sprünge´#	1.06* (0.14)	0.09 (0.02)	2.57 (0.92)	2.83* (1.27)	0.64 (0.20)
23 Sprünge" + 5 Min. Erholung	1.06* (0.22)	0.19 (0.06)	3.50 (0.80)	4.38 (2.33)	0.40 (0.14)
26 Sprünge"´ + 10 Min. Erholung	1.04* (0.16)	0.15 (0.07)	3.40 (0.66)	2.87* (1.16)	0.57 (0.24)
29 Sprünge"" + 20 Min. Erholung	1.07* (0.17)	0.14 (0.11)	3.11 (0.22)	4.55 (1.81)	0.48 (0.06)

´ 27.0 ± 2.6 Sprünge " 23.3 ± 4.7 Sprünge
"´ 25.8 ± 2.2 Sprünge "" 29.3 ± 3.4 Sprünge
* Signifikanter Unterschied ($p>0.05$) zum Kontrollwert

Tabelle 15: Veränderung von Metabolitkonzentrationen (µMol/g FG) in C. tuberculatum nach funktioneller Anaerobiose und während der nachfolgenden Erholung in anaerobem Seewasser (Anoxie) bei 18°C. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung (in Klammern) aus den Messungen an 3 Muscheln.

A. Konzentrationen der Adenylate, sowie die Summe der Adenylate und der errechnete "energy charge" (e.c.)

Bedingungen	ATP	ADP	AMP	Summe	"e.c."
aerobe Kontrolle	2.78 (0.42)	0.58 (0.07)	0.13 (0.04)	3.49 (0.51)	0.88 (0.01)
25 Sprünge´	2.82 (0.13)	0.63 (0.07)	0.14 (0.02)	3.59 (0.04)	0.87 (0.01)
29 Sprünge" + 15 Min. Anoxie	2.48 (0.42)	0.74* (0.07)	0.17 (0.01)	3.38 (0.47)	0.84* (0.02)
28 Sprünge"´ + 30 Min. Anoxie	2.85 (0.32)	0.70 (0.06)	0.18 (0.03)	3.74 (0.23)	0.86 (0.03)

Fortsetzung Tab. 15 auf der nächsten Seite

B. Konzentrationen von Arginin, Argininphosphat und Octopin, sowie die Summe dieser Metabolite und der prozentuale Anteil des Argininphosphats daran

Bedingungen	Arg	ArgP	% ArgP der Summe	Octopin	Summe
aerobe Kontrolle	5.21 (0.27)	8.79 (0.83)	62 (2)	0.22 (0.04)	14.42 (1.07)
25 Sprünge´	7.79* (1.35)	6.47* (0.76)	43 (2)	1.19* (0.56)	15.46 (1.99)
29 Sprünge" + 15 Min. Anoxie	8.22 (2.15)	8.71 (1.11)	52 (5)	0.80 (0.48)	17.73 (3.23)
28 Sprünge"´ + 30 Min. Anoxie	8.53* (0.96)	7.57 (2.35)	47 (6)	0.30 (0.04)	16.40 (2.91)

C. Konzentrationen verschiedener Metabolite des anaeroben Kohlenhydratstoffwechsels

Bedingungen	Glucose-6-P	D-Lactat	Alanin	Aspartat	Succinat
aerobe Kontrolle	0.34 (0.06)	0.08 (0.01)	2.26 (0.69)	4.20 (0.13)	0.17 (0.04)
25 Sprünge´	0.84* (0.19)	0.27* (0.09)	1.92 (0.25)	1.77* (0.16)	0.35* (0.10)
29 Sprünge" + 15 Min. Anoxie	0.91* (0.05)	0.30 (0.15)	1.31 (0.41)	1.01* (0.22)	0.49* (0.06)
28 Sprünge "´ + 30 Min. Anoxie	1.13* (0.25)	0.19* (0.03)	2.23 (0.67)	1.88* (0.91)	0.71* (0.17)

´ 25.3 ± 5.5 Sprünge " 29.0 ± 12.1 Sprünge
"´ 27.7 ± 2.3 Sprünge
* Signifikanter Unterschied ($p>0.05$) zum Kontrollwert

Std. wieder die Werte der aeroben Kontrolltiere erreichten, war der Gehalt an D-Lactat nach dieser Zeit noch 12mal höher als in den Kontrolltieren (Abb. 13). Während der Erholungsphase konnte die Bildung der Endprodukte Octopin, Alanopin oder Strombin nicht nachgewiesen werden. Es erfolgte im Gegenteil ein rascher Abbau der geringen Mengen, die im Verlauf der biotopbedingter Anaerobiose gebildet worden waren.
Die Neubildung von Aspartat, dessen Gehalt nach der Anaerobiose auf 24% des Kontrollwertes reduziert worden war, erfolgte nur langsam, so daß nach 12 Std. der Erholung der Gehalt nur 52% des aeroben Kontrollwertes betrug (Tabelle 13 und Abb. 13C).

7. Metabolische Veränderungen während der Erholung nach funktioneller Anaerobiose

a) Aerobe und anaerobe Erholung aerob gehaltener Muscheln

Der Energiebedarf während intensiver Muskeltätigkeit (23 - 29 Sprünge) wird durch den Abbau von Argininphosphat und die Bildung von Octopin als einzigem Endprodukt der Glykolyse gedeckt (Tabelle 14). Die Konzentrationen von D-Lactat und Alanin verändern sich (mit einer Ausnahme) nicht signifikant (Tabellen 14C, 15C und 16C). Auch die Erhöhung der Succinatkonzentration, die bei jeder Versuchsreihe beobachtet wurde, war gering und nur in einem Versuch (Tabelle 15C) signifikant. In zwei Versuchsreihen war die Aspartatkonzentration nach Muskeltätigkeit deutlich niedriger (Tabellen 14C und 15C), wohingegen in der anderen Versuchsreihe bei ohnehin niedrigeren Aspartat-Werten keine Veränderung festzustellen war.
Hatten sich die Muscheln nach Muskeltätigkeit 20 Minuten in aerobem Seewasser (22°C) oder 30 Minuten in anaerobem Wasser (18°C) erholt, so waren der "energy charge" und die Argininphosphatwerte wieder auf den Ruhewert gestiegen und die Octopinkonzentrationen auf das Niveau der Kontrolltiere gesunken. Bei den Konzentrationen der übrigen Endprodukte waren zwar Unterschiede zwischen den Gruppen mit verschiedenen Erholungszeiten festzustellen, aber diese waren nicht einheitlich oder nicht signifikant. Eine Ausnahme macht nur der Gehalt an Succinat, der während der Erholung in anaerobem Wasser signifikant ansteigt (Tabelle 15C, Abb. 14A und B).
Auch während der Erholung von funktioneller Anaerobiose ist keinerlei Bildung von Alanopin oder Strombin nachzuweisen.

Tabelle 16: Veränderung einiger Metabolitkonzentrationen (µMol/g FG) in C. tuberculatum während funktioneller Anaerobiose nach anaerober Vorinkubation und bei nachfolgender Erholung in anaeroben Seewasser (Anoxie) bei 16°C. Angegeben ist der Mittelwert mit einer Standardabweichung (in Klammern) aus den Messungen an 3 (#) bzw. 4 Muscheln.

A. Konzentrationen der Adenylate, sowie die Summe der Adenylate und der errechnete "energy charge" (e.c.)

Bedingungen	ATP	ADP	AMP	Summe	"e.c."
6 Std. Anaerobiose	2.72 (0.48)	0.73 (0.09)	0.17 (0.03)	3.62 (0.53)	0.85 (0.02)
6 Std. Anaerobiose + 26 Sprünge´	2.38 (0.41)	0.84 (0.04)	0.21 (0.06)	3.43 (0.32)	0.81 (0.04)
+ 25 Sprünge" + 30 Min. Anoxie	2.04* (0.06)	0.73 (0.12)	0.20 (0.05)	2.95 (0.20)	0.82 (0.03)
+ 27 Sprünge"´# + 45 Min. Anoxie	2.00 (0.18)	0.75 (0.04)	0.24* (0.03)	3.02 (0.13)	0.78* (0.03)

B. Konzentrationen von Arginin, Argininphosphat und Octopin, sowie die Summe dieser Metabolite und der prozentuale Anteil des Argininphosphats daran

Bedingungen	Arg	ArgP	% ArgP der Summe	Octopin	Summe
6 Std. Anaerobiose	6.38 (1.83)	10.00 (2.45)	60 (9)	0.28 (0.06)	16.66 (2.14)
6 Std. Anaerobiose + 26 Sprünge	9.91* (0.71)	5.48* (1.21)	33 (6)	1.14* (0.24)	16.53 (1.33)
+ 25 Sprünge" + 30 Min. Anoxie	9.23 (1.12)	6.60* (0.67)	41 (4)	0.50 (0.18)	16.32 (0.80)
+ 27 Sprünge"´# + 45 Min. Anoxie	8.39 (0.47)	8.12 (0.71)	48 (1)	0.26 (0.01)	16.72 (1.17)

Fortsetzung Tab. 16 auf der nächsten Seite

C. Konzentrationen von G6P, D-Lactat, Alanin, Aspartat und Succinat

Bedingungen	Glucose-6-P	D-Lactat	Alanin	Aspartat	Succinat
6 Std. Anaerobiose	0.59 (0.09)	1.34 (0.12)	3.61 (0.81)	0.97 (0.36)	1.07 (0.33)
6 Std. Anaerobiose + 26 Sprünge	0.91 (0.41)	1.21 (0.19)	3.10 (0.68)	1.01 (0.13)	1.27 (0.31)
+ 25 Sprünge" + 30 Min. Anoxie	1.30* (0.12)	1.44 (0.18)	3.98 (1.14)	0.55* (0.23)	1.64* (0.15)
+ 27 Sprünge"´ + 45 Min. Anoxie	0.98* (0.14)	1.78* (0.22)	3.71 (0.47)	0.47* (0.24)	1.23 (0.12)

´ 26.5 ± 6.8 Sprünge in 101 ± 46 Sekunden
" 25.3 ± 4.3 Sprünge, "´ 27.0 ± 5.3 Sprünge
* Signifikanter Unterschied ($p > 0.05$) zum Kontrollwert

Tabelle 17: Vergleich des Energieverbrauchs (µMol ATP/g FG) und der Energieverbrauchsrate (µMol ATP/g FG/Min.) bei 23°C in aeroben Kontrolltieren, während 15 Std. der anaeroben Inkubation und bei 27 Fluchtbewegungen. Die Werte wurden aus dem Sauerstoffverbrauch und den Angaben in den Tabellen 13 und 14 errechnet.

Zeit	ATP-Äquivalente aus (µMol/g FG) Glykolyse	Phosphagenen	ATP-Verbrauchsrate (µMol/g FG/Min.)	Verhältnis $\frac{\text{anaerob}}{\text{aerob}}$
1 Std. aerob	33.0*		0.55	1
15 Std. biotopbedingte Anaerobiose	18.9	5.3 (22%)´	0.027	0.049
77 Sek. Muskeltätigkeit	2.6	3.9 (60%)´	5.04	9.2

* Aus dem Sauerstoffverbrauch von 5.5 µMol O_2/Std./g FG unter der Annahme errechnet, daß 6 µMol ATP pro 1 µMol O_2 gebildet werden.
´ Anteil der Phosphagene an der gesamten anaeroben ATP-Produktion

b) Anaerobe Erholung anaerob vorinkubierter Muscheln

Für diese Versuchsreihe wurden Muscheln nach sechsstündiger anaerober Vorinkubation bei 16°C (Tabelle 16) zur Ausführung ihrer Fluchtbewegung veranlaßt, so daß sie gezwungen waren, ihren erhöhten Energiebedarf durch den Abbau von Argininphosphat und die Bildung von Octopin zu decken (siehe Teil C, III, 1). Die Argininphosphat-Konzentrationen wurden währenddessen nur geringfügig abgebaut und waren demnach noch relativ hoch.
Innerhalb von 45 Minuten anaerober "Nachinkubation" waren die Argininphosphatmengen, die im Verlauf der Muskeltätigkeit verbraucht worden waren, noch nicht wieder vollständig aufgefüllt. In der gleichen Zeit fiel der Wert des "energy charge" von 0.81 nach Muskeltätigkeit auf 0.78 und zeigte damit an, daß der Organismus der Muschel unter anaeroben Bedingungen nicht in der Lage ist, den Energiezustand der Gewebe aufrecht zu erhalten und gleichzeitig seine Argininphosphatreserven wieder herzustellen. Die Konzentration des Octopins, das während der funktionellen Anaerobiose angehäuft worden war, kehrte unter diesen anaeroben Bedingungen innerhalb von 45 Minuten zum Ausgangswert vor der Muskeltätigkeit zurück (Tabelle 16C). Die Konzentration des D-Lactats nimmt mit der Dauer der anaeroben Ruhephase nur geringfügig, aber signifkant zu, gleiches gilt auch für die Konzentration des Succinats, aber nur tendenziell für Alanin. Der bereits durch die anaerobe Vorinkubation erniedrigte Aspartat-Gehalt wird dabei noch weiter verringert (Tabelle 16C, Abb. 14C).

IV. Diskussion

Ein Organismus, dem nach biotopbedingter oder funktioneller Anaerobiose wieder ausreichend Sauerstoff zur Verfügung steht, kann auf zwei verschiedenen Wegen zu den normalen aeroben stoffwechselphysiologischen Bedingungen zurückkehren. So können die metabolischen Veränderungen, die durch den anaeroben Stoffwechsel verursacht worden sind, dadurch rückgängig gemacht werden, daß die Phosphagenreserven wieder aufgefüllt werden und aus den jeweiligen Endprodukten wieder die Substrate Glykogen und Aspartat gebildet werden. In diesem Fall müßte die Sauerstoffschuld, die während der Erholung "zurückgezahlt" wird, so groß sein, daß die Menge der ATP-Äquivalente, die bei der Veratmung des Sauerstoffs

gebildet wird, in etwa der anaeroben Energieproduktion entspricht.
Die andere - vielleicht raschere Möglichkeit - ist folgende: Die verbrauchte Menge an Phosphagen wird ebenfalls aufgefüllt, aber die übrigen Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels werden im Krebs-Zyklus vollständig oxidiert.
Nur mittels eines Vergleiches des Sauerstoffverbrauchs mit den Veränderungen der Metabolitkonzentrationen kann entschieden werden, welcher der beiden beschriebenen Stoffwechselvorgänge bei C. tuberculatum abläuft, um eine schnelle und effektive Erholung von biotopbedingter oder funktioneller Anaerobiose zu gewährleisten. Ebenso ergibt der Vergleich, ob der eingeschlagene Weg vom Ausmaß der Anaerobiose abhängt.

1. Sauerstoffverbrauch

Natürlich ist der Sauerstoffverbrauch (µMol O_2/Std/g FG) von C. tuberculatum stark abhängig von verschiedenen Parametern wie z.B. Wassertemperatur und Größe des Tieres (s. Dejours 1981). Dennoch ergibt ein Vergleich des Sauerstoffverbrauchs von C. tuberculatum mit dem ähnlich großer Muscheln (z.B. Venus gallina oder Tellina planata), die ebenfalls im Golf von Neapel vorkommen, daß der Sauerstoffverbrauch in C. tuberculatum nahezu doppelt so hoch ist wie in diesen: 5.5 µMol O_2 bei 23°C gegenüber 2.7 bzw. 2.0 µMol O_2/Std./g FG bei 24°C (Kluytmans et al. 1983).
Die Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs bei C. tuberculatum vom äußeren Sauerstoffpartialdruck (Abb. 8) wurde auch bei anderen Muscheln beobachtet (Mangum und van Winkel 1973, Famme und Kofoed 1980). Die nur allmählich abnehmende Sauerstoffverbrauchsrate bis hinab zu einem Po_2 von 70 Torr ist im allgemeinen die Folge einer Regulation der Sauerstoffaufnahme durch Verstärkung der Ventilation (Dejours 1981). Wie aber Herreid (1980) ausführte, tritt dieses Phänomen auch bei Tieren mit einem niedrigen Sauerstoffbedarf auf, den sie auf Grund einer großen Oberfläche und geringer Diffusionsdistanzen selbst noch bei erniedrigtem Sauerstoffpartialdruck ohne Regulation der Sauerstoffaufnahme decken können.
Die Tatsache, daß der Sauerstoffverbrauch bei einem Po_2 von 47 Torr und weniger (Abb. 8) linear abnimmt, bedeutet nicht, daß die Sauerstoffversorgung nicht mehr für einen gänzlich aeroben Stoffwechsel ausreicht. Es wurde am Beispiel von Mytilus edulis gezeigt (Bayne und Livingstone 1977), daß diese Tierart in der Lage ist, sich hypoxischen Bedingungen durch eine Reduzierung des

Sauerstoffbedarfs und damit des Energiebedarfs anzupassen.
Entsprechend wiesen Pörtner et al. an dem marinen Wurm Sipunculus nudus nach, daß der Sauerstoffpartialdruck, der den Übergang von reguliertem zu Po_2-konformen (scheinbar ungenügenden) Sauerstoffverbrauch markiert, oberhalb des Po_2-Wertes liegt, bei dem eine Beteiligung des anaeroben Stoffwechsels an der Energieproduktion nachzuweisen ist (1984).
Es wäre von Interesse, für C. tuberculatum den kritischen Po_2 des Übergangs von aerobem zu anaerobem Stoffwechsel von zu bestimmen, da diese Muschel einerseits ihren Energieverbrauch bei biotopbedingter Anaerobiose auf ca. 5% des aeroben Bedarfs reduzieren kann (Tabelle 17), anderseits aber sehr empfindlich gegenüber unzureichender Sauerstoffversorgung ist.
Dieses Phänomen kann anhand folgende Beobachtungen erklärt werden: Zum einen setzt der anaerobe Stoffwechsel sofort mit Beginn der anaeroben Inkubation und schon bei wenigen Fluchtbewegungen (s. Abb. 3 in Teil B, III, 1 und Abb. 6 und 7 in Teil C, III, 1) ein, zum anderen ergab die Messung des Po_2 in der Hämolymphe, daß die innenliegenden Gewebeschichten die geringen Mengen gelösten Sauerstoffs (keine Respirationspigmente) selbst in 6 Std. der Anaerobiose nicht verbraucht haben (noch 28 Torr). Außerdem bleibt bei C. tuberculatum bei Muskeltätigkeit der Po_2 in der Hämolymphe in hohen Bereichen. Diese Punkte sind von besonderer Wichtigkeit, da z.B. der Pfeilschwanzkrebs Limulus polyphemus, der ein gut entwickeltes Kreislaufsystem und Hämocyanin als Blutfarbstoff besitzt, in ebenfalls 2 Minuten Muskeltätigkeit ca. 75% der Sauerstoffreserven in der Hämolymphe verbraucht (Carlsson 1984). Aus diesen Beobachtungen kann der Schluß gezogen werden, daß bei C. tuberculatum die Kapazitäten des aeroben Stoffwechsels, besonders in den inneren Gewebeschichten, nicht groß sind und daß die Versorgung der Muschel mit Sauerstoff direkt über die Körperoberfläche erfolgt, so daß ein eventueller Sauerstofftransport im Tier keine Rolle spielen kann. Für diese Überlegung spricht auch die vielfach beobachtete Verhaltensweise der Versuchstiere, die nach längerer biotopbedingter Anaerobiose oder intensiver Muskeltätigkeit die Schalen weit geöffnet halten, um einen möglichst raschen Wasseraustausch an der gesamten Körperoberfläche zu gewährleisten.

2. Erholung nach biotopbedingter Anaerobiose

Die Muscheln, die ihre Schalen während der anaeroben Inkubation und bei der Rückführung in gut belüftetes Seewasser offen halten, beginnen die

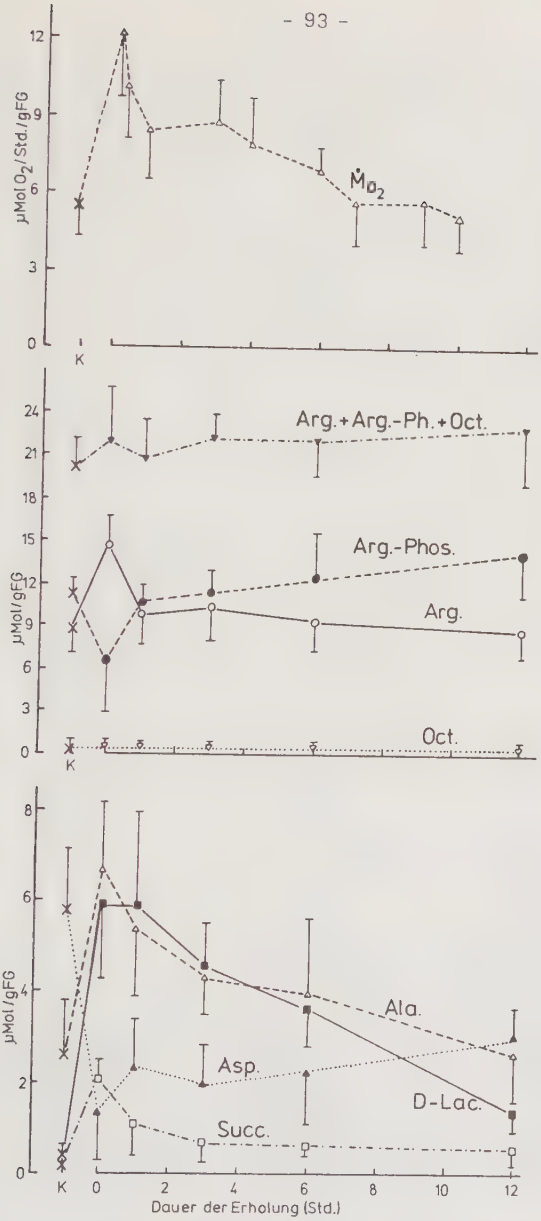

Abb. 13: Die Veränderungen des Gehalts der argininhaltigen Metabolite (mittlere Figur) und einiger Metabolite des anaeroben Kohlenhydratstoffwechsels (unten) während der Erholung nach 15 Std. biotopbedingter Anaerobiose (s. Tabelle 13) im zeitlichen Vergleich mit dem Sauerstoffverbrauch (s. Abb. 11).

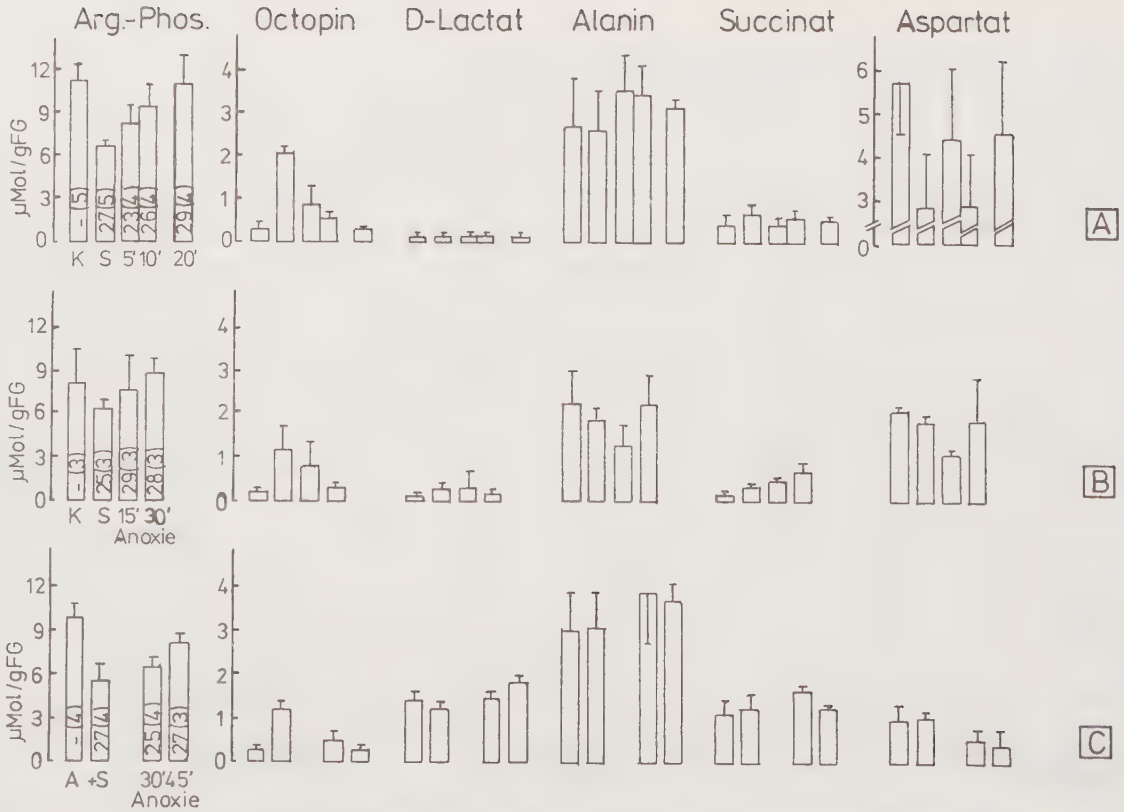

Abb. 14: Der Gehalt des Argininphosphats und der Metabolite des Kohlenhydratstoffwchsels im gesamten Weichkörper nach Muskeltätigkeit und während der Erholungsphase danach:
A: Kontrolltiere (K), Springen (S) und Erholung in aerobem Wasser (23°C, s. Tabelle 14).
B: Springen in aerobem, Erholung dagegen in anoxischem Seewasser (18°C, s. Tabelle 15).
C: Anaerobe Vorinkubation (A), Springen in hypoxischen und Erholung in anoxischem Wasser (Anoxie, 16°C, s. Tabelle 16). In den Saulen stehen die Zahl der Muschel sowie Sprünge.

Erholungsphase mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch. Der zeitliche Verlauf des Sauerstoffverbrauchs während der Erholung weist Paralellen zu den metabolischen Veränderungen auf: Es tritt zunächst eine kurze Periode (ca. 1 Stunde) stark erhöhten Sauerstoffverbrauchs ein, in der die verbrauchten Phosphagenreserven wieder aufgebaut werden. Es folgt ein ausgedehnter Zeitraum (10 Stunden) mäßig erhöhten Sauerstoffverbrauchs, während dessen Verlauf die Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels oxidiert werden (Abb. 13).
Verschiedene Muschelarten wie Mytilus edulis, Geukensia demissa und Crassostrea gigas (de Zwaan et al. 1983, Nicchitta und Ellington 1983, Eberlee et al. 1983) bilden die Endprodukte Strombin und/oder Alanopin zu Beginn der Erholung nach biotopbedingter Anaerobiose. Im Gegensatz dazu war in der Anfangsphase der Erholung, in der die Argininphosphat-Reserven wieder aufgefüllt werden, keine Anhäufung von Endprodukten des anaeroben Stoffwechsels bei C. tuberculatum festzustellen, d.h. gibt es keine "anaerobe" Erholungsphase. Erklärt wird dieses Phänomen damit, daß bei jenen Arten ein Anstieg der Glykolyserate in diesem Zeitraum stattfindet. Dagegen bleibt bei C. tuberculatum eine solche Steigerung der Glykolyse aus, denn weder entspricht die Zunahme des Sauerstoffverbrauchs (3.5fach, Tabelle 12B) der errechneten Steigerung der Glykolyserate (ca. 70fach, Teil C, IV, 3), noch werden in der Erholungsphase anaerobe Endprodukte gebildet (Abb. 14).
Der lineare Verlauf der Bildung und der Oxidation des D-Lactats wurde nicht nur bei C. tuberculatum (s. Abb. 13, und Abb. 2 in Teil B, III), sondern auch bei den Muscheln C. edule und Modiolus squamosus beobachtet (Meinardus und Gäde 1981, Gäde und Meinardus 1981, Nicchitta und Ellington 1983). Dies ist ein Hinweis, daß bei diesen Arten der Ort der D-Lactat-Bildung, d.h. das Cytoplasma der Zellen, auch der Ort der Oxidation und der weiteren Umsetzung des D-Lactats ist. Ein Gegenbeispiel hierzu ist Limulus polyphemus, bei dem im Hepatopankreasgewebe eine kontinuierliche Bildung von D-Lactat bei Anaerobiose und ein rascher Abbau desselben während der Erholung beobachtet wurde, obwohl im Muskel die D-Lactat-Konzentration erst nach langer Erholungsdauer zu sinken beginnt. Anhand dieser Befunde wurde diskutiert, daß das D-Lactat bei L. polyphemus im Nichtmuskelgewebe des Hepatopankreas oxidiert und zu diesem Zweck auch aus den Muskeln dorthin transportiert wird (Carlsson 1984).

Bei C. tuberculatum nehmen die Steigerung und die Dauer des verstärkten Sauerstoffverbrauchs und folglich auch die Sauerstoffschuld mit der Dauer der anaeroben Inkubation zu. Das Ausmaß der Sauerstoffschuld scheint sich aber mit

der Inkubationdauer zu ändern. Bis zu einer Dauer von 6 Std. der Anaerobiose entspricht sie ca. 11% des theoretischen Sauerstoffdefizits, das durch die Anoxie entstanden ist (Tabelle 12). Diese Sauerstoffschuld übertrifft geringfügig die Menge des Sauerstoffs, die zur Rückbildung des Argininphosphats und der Substrate aus den Endprodukten nötig wäre, was der ersten der beiden anfangs dargestellten Möglichkeiten des Erholungsstoffwechsels entspräche. Nach einer Anaerobiosedauer von 10 Std. und mehr steigt die Sauerstoffschuld auf ca. 30% des Sauerstoffdefizits. Diese Sauerstoffmenge übersteigt die Menge, die zur Rückbildung der Substrate notwendig wäre, etwa um das Fünffache. Sie ähnelt aber der Menge (60-90%), die zur Oxidation des angehäuften D-Lactats, Alanins und Succinats benötigt würde. D-Lactat und Alanin sind Derivate des Pyruvats, das leicht in den Krebs-Zyklus gelangen kann, um dort vollständig oxidiert zu werden. Succinat ist selbst ein intermediärer Metabolit des Zyklus.
Der plötzliche Anstieg der Sauerstoffschuld nach mehr als 6 Std. der Anaerobiose wird möglicherweise durch die Veränderung des Energiezustands der Gewebe, der durch den Wert des "energy charge" angezeigt wird, verursacht. Der "energy charge" war nach 10 Std. der Anaerobiose kleiner als 0.85 und damit signifikant geringer als nach 6 Std. (Tabelle 1 in Teil B, III, 1). Diese Deutung würde auch mit den Ergebnissen der Untersuchungen an Mytilus edulis übereinstimmen. Bei dieser Muschel ließ sich die Größe der Sauerstoffschuld nach verschiedenen Zeiträumen biotopbedingter Anaerobiose am besten mit dem jeweiligen Wert des "energy charge" in Zusammenhang bringen (de Vooys und de Zwaan 1978).

3. Erholung nach funktioneller Anaerobiose

Abhängig von der Zahl der Fluchtbewegungen steigt der maximale Sauerstoffverbrauch nach Muskeltätigkeit auf Werte an, die 3.5mal höher liegen als der Verbrauch in Ruhetieren, kehrt aber einheitlich innerhalb von 90 Minuten zu diesem Wert zurück. Nur die große Steigerung des Sauerstoffverbrauchs in den ersten 10 bis 20 Minuten der Erholung nach einer Phase der Muskeltätigkeit (Abb. 12) fällt mit der Wiederherstellung der verbrauchten Argininphosphatreserven und dem Verschwinden des Octopins aus den Geweben zusammen (Abb. 14A).
Die errechnete Sauerstoffschuld (Tabelle 12B) nimmt proportional mit der Anzahl der Sprünge auf einem Basalwert von 2.14 µMol O_2/g FG zu. Diese Erhöhung der basalen Sauerstoffaufnahme mag durch die gesteigerte Glykolyserate bei Muskeltätigkeit bedingt sein (s. Teil C, IV, 3). Sie könnte aber Folge auch einer Stress-Reaktion sein, wie sie bei bei der Herzmuschel C. edule

beobachtet wurde (Widdows et al. 1979). Diese Herzmuschel reagiert auf die Trockenlegung an der Luft mit einer Sauerstoffschuld, ohne daß dabei für diese Art anaerobe Bedingungen entstanden wären, wie der Sauerstoffverbrauch und die Messung der anaeroben Endprodukte zeigt. Betrachtet man die Veränderungen der Metabolitkonzentrationen in C. tuberculatum nach 27 Sprüngen und berücksichtigt man, daß sowohl die anaerobe Energieproduktion als auch der Beitrag der Octopinbildung dazu proportional zur Anzahl der Sprünge sind (s. Abb. 6 und 7 in Teil C, III, 1), so kann man folgendes errechnen: Der variable Anteil der Sauerstoffschuld, der in Abhängigkeit von der Sprungzahl (zusätzlich zur Menge von 2.2 µMol O_2/g FG) während der Erholung aufgenommen wird, entspricht der Menge an Sauerstoff, die veratmet werden muß, um aerob die Menge an ATP-Äquivalenten zu bilden, die durch den anaeroben Stoffwechsel bereitgestellt wurde (Tabelle 12B). Mit der etwaigen vollständigen Oxidation des Octopins kann weder der gesamte noch der sprungabhängige Anteil der Sauerstoffschuld in Zusammenhang gebracht werden.

Wird C. tuberculatum nach Muskeltätigkeit nicht die Gelegenheit gegeben, sich in aerobem Wasser zu erholen, sondern hält man sie danach in sauerstoffreiem Wasser, so verzögert sich die Rückkehr der Argininphosphat- und Octopinkonzentrationen zu den Ruhewerten etwas, sie werden aber innerhalb von 30 Minuten erreicht (Abb. 14B). Auch in dieser anaeroben Situation gilt ebenso wie während der Erholung unter aeroben Bedingungen, daß die Octopinbildung auf die Zeit der Muskeltätigkeit beschränkt ist. Dagegen liefert bei den Pectiniden (s. Gäde 1980a) und einigen mobilen Gastropoden (Baldwin et al. 1981, Gäde et al. 1984) die Bildung von Octopin oder D-Lactat die Energie, die für die Bildung von Argininphosphat benötigt wird. Man ist der Ansicht, daß diese "anaerobe" Erholungsphase ihren Ursprung in der Fortdauer der erhöhten Glykolyserate nach Muskeltätigkeit hat. Auch bei C. tuberculatum finden wir eine ca. 70fache Zunahme des glykolytischen Umsatzes bei Muskeltätigkeit gegenüber dem Ruhewert (s. Teil C, IV, 3). Das Fehlen der "anaeroben" Erholungsphase bei dieser Muschel kann wohl nur mit einer raschen und effektiven Regulation der Glykolyse erklärt werden, die sowohl einen plötzlichen Anstieg als auch eine schnelle Drosselung des Glykolyseumsatzes ermöglicht.
Bei der Erholung in anaerobem Seewasser zeigen sowohl der Wert des "energy charge" als auch der leichte Anstieg der Succinatkonzentration an (Abb. 14B), daß die zur Verfügung stehende Menge gespeicherten Sauerstoffs nicht ausreichte. Werden die Muscheln in anaerobem Seewasser inkubiert, um in den Geweben

anaeroben Bedingungen zu schaffen, bevor die Muskeltätigkeit einsetzt, und werden sie sofort danach wieder anaeroben Bedingungen ausgesetzt, so ist die Erholung unvollständig (Abb. 14C). Die Menge des bei der Muskeltätigkeit abgebauten Argininphosphats wird im Verlauf einer 45-minütigen Ruhepause nur zu ca. 60% wieder hergestellt. Dies wird nur bei weiterem Absinken des "energy charge" erreicht, wodurch deutlich wird, daß kaum aeroben Prozesse an der Argininphosphatbildung beteiligt sind. Dagegen kehren die Octopinkonzentrationen während der anaeroben Ruhephase zu den Werten zurück, die vor der Muskeltätigkeit gemessen wurden. Dieses Phänomen entspricht den Befunden, aus denen hervorgeht, daß in C. tuberculatum bei biotopbedingter Anaerobiose kein Octopin, sondern D-Lactat gebildet wird (s. Abb. 2 in Teil B) und daß die Octopinbildung von der Erhöhung der Glykolyserate abhängt (s. Teil C, IV, 3), welche allerdings, wie oben diskutiert, offensichtlich nicht während der Erholungsphase andauert.

Man hätte demzufolge erwarten können, daß bei Fortdauer der anaeroben Bedingungen nach Muskeltätigkeit das Octopin zwar abgebaut wird, sein Pyruvat-Anteil aber zur Bildung von D-Lactat verwendet wird, wie es bei Gastropoden der Fall zu sein scheint (Baldwin et al. 1981, Gäde et al. 1984). Obgleich ein geringfügiger Anstieg der D-Lactat-Konzentration in C. tuberculatum während der anaeroben Ruhephase zu verzeichnen ist, entspricht er nicht der Menge des abgebauten Octopins. Der Pyruvat-Anteil des Octopins könnte ebenso gut zu Alanin umgesetzt worden sein, aber auf Grund der hohen Standardabweichungen der Meßwerte kann dies nicht eindeutig nachgewiesen werden. Zum Ausgleich der Redoxbilanz bei der Octopinoxidation unter anaeroben Bedingungen wäre die entsprechende Bildung von Produkten der anderen Pyruvatreduktasen zu erwarten. Eine andere Möglichkeit bietet der Abbau von Aspartat mit anschließender Reduktion des Oxalacetats zu Malat (bei C. tuberculatum nicht untersucht) bzw. Succinat.

Mehr noch als die Zunahme des Succinats deutet die weitere Verringerung der Aspartat-Konzentrationen auf den verstärkten anaeroben Stoffwechsel während der anaeroben Ruhepause hin (Abb. 14C, Tabelle 16C).

Die Tatsache, daß weder die Bildung von Argininphosphat noch die anaerobe Umsetzung von Octopin aus den Veränderungen der Konzentrationen der übrigen Endprodukte vollständig erklärt werden kann, muß wohl darauf zurückgeführt werden, daß bei dieser Versuchsreihe eine Beteiligung von aeroben Prozessen an der Erholung nicht ganz ausgeschlosen werden konnte. Die Ausführung der Fluchtbewegungen konnte aus experimentellen Gründen nicht unter strikt

anaeroben, sondern nur unter hypoxischen Bedingungen ablaufen.

Aus dem Sauerstoffverbrauch der Ruhetiere von 5.5 µMol O_2/Std./g FG bei 23°C kann man eine aerobe ATP-Produktionsrate von 0.55 µMol ATP/Min./G FG errechnen (Tabelle 17). Diese aerobe Energieproduktion kann bis auf das 3.5fache (bei 26 Sprüngen) gesteigert werden (Tabelle 11B). Die anaerobe ATP-Produktionsrate beträgt dagegen bei 27 Sprüngen 5.04 µMol ATP/Min./g FG, wie sich aus dem Abbau von 3.9 µMol Argininphosphat und der Bildung von 1.74 µMol Octopin/g FG in 77 Sekunden errechnen läßt. Diese intensive anaerobe Energieproduktion entspricht dem 9.2fachen der aeroben Produktion in Ruhetieren und dem mehr als 2.5fachen der maximalen aeroben Energieproduktion (Tabelle 17). Demzufolge kann die Steigerung der Sauerstoffaufnahme, die ja nur direkt nach der Ausführung der Fluchtbewegung gemessen wurde, auch während der Muskeltätigkeit selbst nicht den erhöhten Energiebedarf decken.
Der Vergleich der ATP-Produktionsrate unter aeroben Verhältnissen mit der bei biotopbedingter Anaerobiose zeigt, daß unter letzteren Bedingungen die Energieproduktion auf 5% des aeroben Wertes reduziert ist. Erstaunlicherweise wird das theoretische Sauerstoffdefizit und damit auch Energiedefizit, das sich während der Dauer der Anaerobiose angesammelt hat, nur zu ca. 10% bis 30% während der Erholung mit der Sauerstoffschuld ausgeglichen (Tabelle 12A). Man könnte daraus schließen, daß der Sauerstoffbedarf zur Deckung des reinen Erhaltungsstoffwechsels nur maximal 30% des gemessenen Sauerstoffverbrauchs der Ruhetiere beträgt.

E. Partielle Reinigung und Charakterisierung der kinetischen Eigenschaften der D-Lactat-, Octopin- und Alanopindehydrogenase aus Muskelgeweben von C. tuberculatum

I. Die Funktion der Pyruvatreduktasen

Die Herzmuschel C. tuberculatum weist in allen Geweben unterschiedliche Aktivitäten mehrerer Pyruvat reduzierender Enzyme auf (s. Teil C und F), die als terminale Dehydrogenasen der anaeroben Glykolyse fungieren können. Für die D-Lactatdehydrogenase (LDH) und die Octopindehydrogenase (ODH) konnten verschiedene Funktionen im anaeroben Stoffwechsel bei biotopbedingter oder funktioneller Anaerobiose nachgewiesen werden. Dagegen ist trotz der bemerkenswerten Aktivität der Alanopin- (AlDH) und Strombindehydrogenase (StDH) die Bildung von Alanopin selbst nach 15 Std. anaerober Inkubation äußerst gering und die von Strombin fehlt sogar zur Gänze.
Aus den gemessenen Aktivitäten der verschiedenen Dehydrogenasen läßt sich aber nicht ableiten, unter welchen Bedingungen ein bestimmtes Pyruvat-Derivat gebildet wird. Aus diesem Grunde wurden die Pyruvatreduktasen isoliert und gereinigt, um ihre kinetischen Eigenschaften im Detail zu untersuchen. Es sollten damit weitere Erkenntnisse über die Faktoren erhalten werden, die bestimmen, welche der verschiedenen auftretenden Enzyme das Pyruvat unter bestimmten physiologischen Bedingungen umsetzen.

II. Reinigungsmethoden und Reaktionsbedingungen

1. Tiermaterial

Die Herzmuscheln der Art C. tuberculatum wurden in April und Mai der Jahre 1982 und 1983 von Fischern in Neapel, Italien, bezogen. Fuß und Schließmuskel wurden herausgetrennt, auf Fließpapier abgetupft und bei -80°C eingefroren. Die gefrorenen Gewebe wurden auf Trockeneis nach Deutschland transportiert und bei -35°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

2. Chemikalien

Die Substrate wurden von der Fa. Boehringer (Mannheim) bezogen, die

verschiedenen Aminosäuren und 2-Oxosäuren, das Octopin und die Substanzen für die Aktivitätsfärbung der Enzymproteine nach Elektrophorese kamen von der Fa. Sigma (Taufkirchen). Die Chromatographie-Medien (DEAE-Sephacel, Sephadex G-100, Sephadex G-25 in vorgepackten PD-10 Säulen, Blue Sepharose CL-6B) waren Produkte der Fa. Pharmacia (Freiburg). Die Substanzen zur Herstellung der Polyacrylamid-Gele und für die Protein-Bestimmung stammten von der Fa. Bio-Rad Laboratories (München), die Substrate Pyruvat, L- und D-Lactat von der Fa. Serva (Heidelberg), Arginin, Succinat und alle übrigen Chemikalien höchster Reinheit von der Fa. Merck (Darmstadt).
D-Strombin und meso-Alanopin, die nach einem Verfahren von T.P. Mommsen und P.W. Hochachka (unveröffentlicht) synthetisiert worden waren, wurden mir freundlicherweise von U. Kreutzer (Universität Düsseldorf) überlassen.

3. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Routinemäßige Bestimmungen der Enzymaktivitäten wurden bei 25°C an einem Vitatron DPC 4 Filterphotometer (340 nm) mit angeschlossenem Schreiber durchgeführt. Falls erforderlich, wurden die Enzymproben über eine PD-10 Säule gegeben, um niedermolekulare Substanzen abzutrennen. Der Testansatz (1 ml) zur Bestimmung der LDH-Aktivität enthielt 0.15 mM NADH, 2.5 mM Pyruvat in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.1; 5 mM Arginin, 100 mM Alanin oder 200 mM Glycin wurden sodann hinzugefügt, um die Aktivitäten der ODH und AlDH bzw. StDH zu messen.
Für kinetische Untersuchungen der pyruvatreduzierenden Reaktionen wurden die Bestimmungen in 0.2 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.0, bei veränderten Konzentration von NADH, Pyruvat, Arginin, Alanin, Glycin und Inhibitoren durchgeführt. Die substratoxidierende Reaktion wurde bei einem pH-Wert von 8.4 in einem Testsystem gemessen, das 0.2 M Tris, 0.4 M Hydrazinhydrat, 1 mM EDTA und verschiedene Konzentrationen an NAD^+, D-Lactat, Octopin und meso-Alanopin bzw. D-Strombin enthielt. In diesem Testansatz war die Anwesenheit von EDTA erforderlich, um die oxidierende Aktivität der AlDH und StDH messen zu können.

4. Proteinbestimmungen

Die Veränderungen des Proteingehalts im Eluat der Chromatographie-Säulen wurde durch Messung der Transmission bei 280 nm registriert.

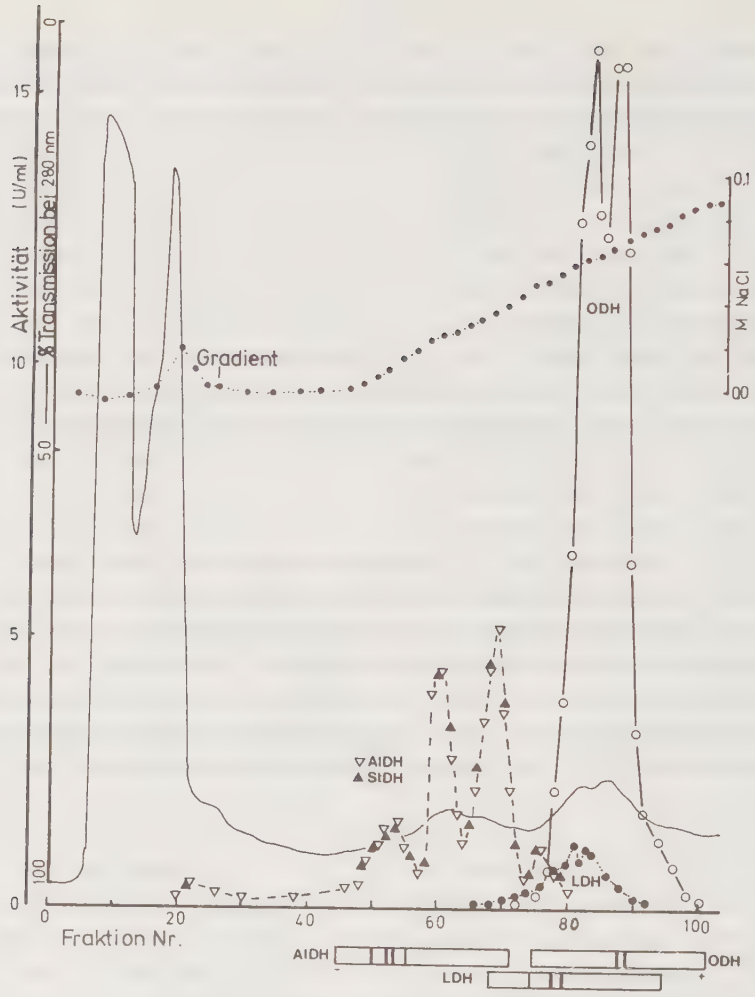

Abb. 15: Elutionsprofil der Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sephacel (pH 7.5) mit einem linearen NaCl-Gradienten für die StDH/AlDH, LDH und ODH aus einem Fußextrakt. Unten ist das Muster der elektrophoretischen Trennung nach Anfärbung der Gele auf die entsprechende Enzymaktivität widergegeben.

Die Bestimmung des Proteingehalts der Enzympräparate nach den einzelnen Reinigungsschritten und im gereinigten Präparat erfolgte nach der Methode von Bradford (1976), wobei Gamma-Globulin als Proteinstandard diente.

5. Reinigung der Enzyme

Alle präparativen Schritte wurden bei 0 - 4°C durchgeführt; alle Puffer enthielten 10 mM Mercaptoäthanol und 0.1 mM EDTA.
Frisch aufgetautes Fuß- bzw. Schließmuskelgewebe wurde im fünffachen Volumen (w/v) eiskalten Puffers (50 mM Kaliumphosphat, pH 7.5) homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 Minuten bei 30000xg zentrifugiert. Der Überstand (Rohextrakt) wurde sodann durch Zugabe von feingemörsertem Ammoniumsulfat auf 50% Sättigung gebracht. Die dabei ausfallenden Proteine wurden abzentrifugiert (s.o.)und zum Überstand weiter Ammoniumsulfat hinzugefügt, bis 80% Sättigung erreicht wurde. Das Präzipitat wurde über Nacht gerührt und wie beschrieben zentrifugiert. Das entstehende Sediment wurde in ca. 5 ml 25 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7.6) gelöst und dann die Suspension entsalzt, indem Teilmengen über eine PD-10 Säule (9 ml) gegeben wurden.
Die entsalzten Enzymlösungen wurden gemeinsam auf eine DEAE-Sephacel-Säule (3.2 x 29 cm) gegeben, die vorher mit 25 mM Tris-Puffer, pH 7.6, äquilibriert worden war. Die Enzyme, die unter diesen Bedingungen an den Ionenaustauscher gebunden hatten, wurden mit einem linearen Gradienten von 0 bis 200 mM in einem Liter des Äquilibrationspuffers eluiert (28 ml/Std., 7ml pro Fraktion). Die genaue Salzkonzentration, bei der ein Enzym eluiert wurde, wurde durch Messen der Leitfähigkeit ermittelt. Zuerst wurden die Aktivitäten von AlDH und StDH zusammen in wenigstens vier Aktivitätsgipfeln ("peaks") bei 30 bis 50 mM NaCl eluiert (Abb.15).Die Elution der ODH-Aktivitäten erfolgte mit zwei "peaks" bei 65 bzw. 75 mM NaCl. Die LDH erschien in einem breiten "peak" zwischen den Aktivitäten der AlDH/StDH und ODH (Abb. 15). Aus fünf Elutionsbereichen wurden die einzelnen Fraktionen vereinigt und weiter gereinigt: Zwei Bereiche deckten die höchsten "peaks" der AlDH/StDH-Aktivität ab. Diese werden im Folgenden als AlDH I und AlDH II bezeichnet. Ein anderer Bereich enthielt den größten Teil der LDH-Aktivität und die letzten beiden entsprachen den beiden "peaks" der ODH-Aktivität, die als ODH I und ODH II bezeichnet werden.
Die fünf verschiedenen Enzymlösungen wurden, jeweils durch Ultrafiltration in einer Amicon-Zelle mit PM 10 Membran (Fa. Amicon, Witten) konzentriert und einzeln einer Molekulargewichtschromatographie auf einer Sephadex G-100 Säule

unterzogen. Die Säule war zuvor mit 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.5, bei einer Flußrate von 12 ml/Std. (4 ml pro Fraktion) äquilibriert worden und wurde auch unter diesen Bedingungen eluiert. Die Aktivitäten von ODH, AlDH und StDH erschienen im gleichen Elutionsvolumen in einem einzelnen, gleichförmigen Aktivitätsgipfel. Die Aktivität der LDH wurde in zwei getrennten "peaks" eluiert, die als LDH I und LDH II bezeichnet wurden (Abb. 16).
Die Enzympräparationen, die AlDH/StDH-Aktivitäten enthielten, wurden nach der Gelfiltration auf eine Säule (2 x 17 cm) mit Blue Sepharose CL-6B gegeben. Dieses Medium für die Affinitätschromatographie wurde unter den gleichen Bedingungen wie das Sephadex G-100-Gel äquilibriert und eluiert. Die AlDH/StDH wurde unter diesen Bedingungen an das Blue Sepharose-Gel gebunden und sodann mit einem linearen Gradienten von 0 bis 0.1 mM NADH oder einem Gradienten von 0 bis 0.25 M NaCl in 250 ml Phosphat-Puffer (s.o.) gelöst. Die Elution der AlDH I erfolgte bei 70 mM, die der AlDH II bei 75 mM NaCl. Es wurde die Elution mit einem NaCl-Gradienten bevorzugt, da man auf diese Weise NADH-freie Präparate der AlDH/StDH erhält.
Anschließend an die diversen Reinigungsschritte wurden die Fraktionen getrennt nach den Aktivitäten der LDH, ODH bzw. AlDH/StDH vereinigt, sodann für jedes Enzym einzeln konzentriert (s.o.) und als Enzymquelle für die kinetischen Untersuchungen benutzt, die in den folgenden zwei Monaten durchgeführt wurden. Selbst in Gegenwart von 14 mM Mercaptoäthanol, 20% Glycerin oder 0.02% Natriumazid verloren die Präparate der AlDH/StDH innerhalb von 3 Monaten 50% ihrer Aktivität, wobei dieser Verlust bei basischem pH-Wert noch ausgeprägter war. Die Präparationen der LDH und ODH verloren in 6 Monaten nur wenig von ihrer Aktivität.

6. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die diskontinuierliche Elektrophorese wurde nach der geringfügig modifizierten Vorschrift von Davis (1964) ausgeführt: Es wurde eine 8.3%ige Acrylamidkonzentration für die Trenngele und ein Tris/HCl-Puffer, pH 8.9, als Laufpuffer verwendet. Die Gele wurden spezifisch auf Enzymaktivität angefärbt und dazu in einer Lösung inkubiert, die 1 mg NAD^+, 0.05 mg Phenazinmethasulfat, 0.5 mg Nitroblue Tetrazolium pro ml 0.2 M Tris/HCl-Puffer, pH 8.5, 1 mM EDTA und 50 mM D-Lactat, 3.75 mM Octopin, 1.5 mM Alanopin bzw. 11 mM Strombin enthielt. Nachdem die Gele in 7%iger Essigsäure fixiert worden waren, wurde die Absorption der Gele bei 585 nm gegen die Laufstrecke der

Proteine aufgezeichnet und aus diesen Aufzeichnungen die relative Laufstecke (r_f-Wert) des Enzyms in Relation zu der mitgelaufenen Markierungssubstanz Bromphenolblau ermittelt.

7. Bestimmung des Molekulargewichts

Das Molekulargewicht der gereinigten nativen Enzyme wurde durch Molekulargewichtschromatographie bestimmt. Eine Sephadex G-100 Säule (2 x 90 cm) wurde mit 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.5, bei einer Flußrate von 12 ml pro Stunde äquilibriert und mit Katalase (240kDa), Aldolase (148kDa), Rinderserum-Albumin (68kDa), Ovalbumin (90kDa und 45kDa) sowie Chemotrypsinogen A (25kDa) geeicht.

8. Bestimmung der kinetischen Parameter

Aus den Meßwerten von Versuchsreihen, bei denen die Konzentration eines einzelnen Substrats (A) verändert wurde, während die der anderen Substrate konstant gehalten wurden, wurden die Steigung und der Ordinatenachsenabschnitt der entsprechenden Geradengleichung (1) im Lineweaver-Burk-Diagramm errechnet und aus diesen beiden Werten die apparente Michaelis-Menten-Konstante (K_M) ermittelt.

$$1/v = 1/V + K_A/V\ (1/A) \qquad (1)$$

K_A ist der K_M-Wert des Substrates A, V die relative maximale Reaktionsgeschwindigkeit.

Weiterhin konnten anhand der Ergebnisse von Meßreihen, bei denen die Konzentrationen zweier Substrate (A und B) verändert wurden, die K_M-Werte beider Substrate bestimmt werden. Dies geschah entsprechend der Gleichungen (2) oder (3), je nach dem, ob der Reaktionsmechanismus "ordered sequential" oder "random ordered" war.

$$v = VAB/(K_{ia}K_B + K_AB + K_BA + AB) \qquad (2)$$

$$v = VAB/(K_{ia}K_B + K_BA + AB) \qquad (3)$$

K_{ia} ist die Dissoziationskonstante des Substrats A und K_B ist der K_M-Wert des Substrats B.

Ergibt das Lineweaver-Burk-Diagramm von 1/v gegen 1/A bei verschiedenen Konzentrationen von B sich schneidende Geraden, so kann man aus der Auftragung der Steigungen und Achsenabschnitte dieser Geraden gegen 1/B die Werte von K_A und K_B ermitteln (Rudolph und Fromm 1979). Auf diese Weise erhält man absolute Werte für die Reaktion der LDH und für die octopinoxidierende Reaktion

der ODH, sowie apparente K_M-Werte des Pyruvats und der Aminosäuren für die AlDH/StDH-Reaktion bei einer bestimmten NADH-Konzentration.
Inhibitorkonstanten (K_I) wurden aus der Auftragung von 1/v gegen die Inhibitorkonzentration I im Dixon-Diagramm ermittelt.

9. Bestimmung der appparenten Gleichgewichtskonstanten (app. K_{eq})

Ausgehend von verschiedenen Konzentrationen von NAD^+ und D-Lactat, Octopin, meso-Alanopin bzw. D-Strombin wurde der Endpunkt der Rückreaktion von LDH, ODH, AlDH bzw. StDH im 0.2 M Phosphatpuffer bei pH 7.0 bestimmt. Aus dem sich einstellenden Gleichgewicht zwischen den vorgegebenen Substraten und den gebildeten identischen Mengen an NADH, Pyruvat und der betreffenden Aminosäure läßt sich der apparente K_{eq} -Wert abschätzen.

III. Ergebnisse

1. Optimierung der Testbedingungen

In einem Vorversuch wurde Muskelgewebe von C. tuberculatum in 0.1 M Kaliumphosphat-, Imidazol-, Triäthanolamin/KOH- bzw. Tris/HCl-Puffer, jeweils pH 7,5 homogenisiert. Die Aktivitäten in jedem dieser vier Extrakte wurden in vier verschiedenen Standardtests gemessen, in denen die entsprechenden Puffer als Bestandteil des Testsystems (pH 7.0) enthalten waren, d.h. für jede einzelne Aktivität wurden 16 Bestimmungen durchgeführt.
Die höchsten Aktivitäten wurden für alle Dehydrogenasen gemessen, wenn Phosphat- oder Imidazolpuffer sowohl als Homogenisations- als auch als Testpuffer verwendet wurde. Im Gegensatz zu der AlDH/StDH des Wattwurms Arenicola marina (Siegmund et al. 1985) war die Aktivität der AlDH/StDH aus Muskelgeweben von C. tuberculatum unabhängig von der Konzentration des Mercaptoäthanols im Testansatz.

2. Reinigung der Dehydrogenasen

Das Ziel der Reinigung war nicht, homogene Präparate der verschiedenen Enzyme herzustellen, sondern die einzelnen Pyruvatreduktasen frei von den Aktivitäten der anderen Dehydrogenasen zu gewinnen.

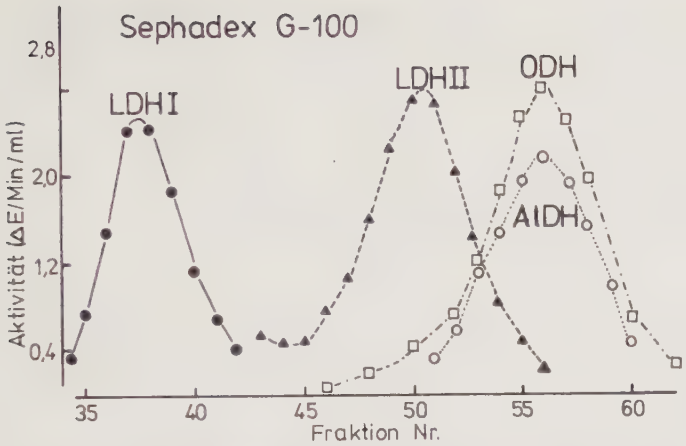

Abb. 16: Elutionsverhalten der Pyruvatreduktasen bei einer Molekulargewichtsgelchromatogrphie an Sephadex G-100.

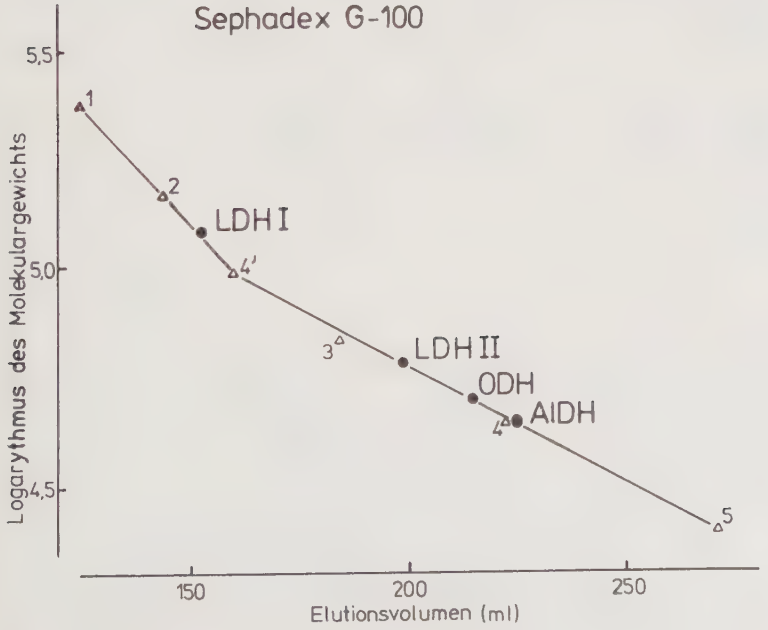

Abb. 17: Bestimmung des nativen Molekulargewichts von LDH I, LDH II, ODH und AlDH durch analytische Gelfiltration an Sephadex G-100. Eichproteine: Katalase 240 kDa (1), Aldolase 148kDa (2), Rinderserumalbumin 68 kDa (3), Ovabumin 90 kDa (4') und 45 kDa (4) sowie Chymotrypsinogen A 25 kDa (5).

Tabelle 18: Reinigungstabelle für die Reinigung der drei Pyruvatreduktasen aus Fußmuskelgewebe (20 g) von C. tuberculatum. Es wurden drei Reinigungen mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

Reinigungsschritt	Gesamtaktivität (U) LDH	ODH	AlDH	Protein total (mg)	Spezifische Aktivität (U/mg protein) LDH	ODH	AlDH	Anreicherung (-fach) LDH	ODH	AlDH	Ausbeute (%) LDH	ODH	AlDH
Rohextrakt	77.5	1852.1	578.3	904.3	0.086	2.05	0.64	1.0	1.0	1.0	100	100	100
50% - 80% Ammoniumsulfatsättigung	41.1	1063.1	375.9	71.6	0.57	14.85	5.25	6.7	7.2	8.2	53	57.4	65.4
DEAE-Sephacel													
AlDH I	-	-	103.5	6.0	-	-	17.2	-	-	26.9	-	-	17.9
AlDH II	4.65	-	124.9	3.8	1.22	-	32.9	14.2	-	51.4	6.0	-	21.6
´LDH´	11.6	24.1	25.4	5.4	2.16	4.48	4.73	25.1	2.3	3.4	15.0	1.3	4.4
ODH I	5.58	329.7	-	3.2	1.72	102.5	-	20.1	50.0	-	7.2	17.8	-
ODH II	1.55	487.1	-	4.0	0.38	120.9	-	4.4	59.0	-	2.0	26.3	-
										Summe:	32.0	45.4	43.9
Sephadex G-100													
AlDH I	-	-	96.6	1.92	-	-	50.4	-	-	78.8	-	-	16.7
AlDH II	0.80	-	116.8	2.02	0.40	-	57.8	4.7	-	90.3	1.0	-	20.2
LDH I	4.26	-	-	0.73	5.80	-	-	64.5	-	-	5.5	-	-
LDH II	6.20	-	-	0.81	7.62	-	-	88.6	-	-	8.0	-	-
ODH I	-	272.3	-	1.41	-	192.5	-	-	93.4	-	-	14.7	-
ODH II	-	401.9	-	1.63	-	246.7	-	-	120.3	-	-	21.7	-
										Summe:	14.5	36.4	36.9
Blue Sepharose CL-6B													
AlDH I	-	-	56.9	0.83	-	-	68.4	-	-	106.9	-	-	9.8
AlDH II	-	-	68.8	0.99	-	-	69.3	-	-	108.3	-	-	11.9
										Summe:			21.7

Die Aktivitäten der ODH und AlDH/StDH konnten durch Ionenaustauscherchromatographie (Abb. 15) getrennt werden, während zwei Proteine mit LDH-Aktivität sich auf Grund ihres Molekulargewichts bei der Gelfiltration trennten (Abb. 16).
Ein typisches Reinigungsverfahren für die Dehydrogenasen aus dem Fußmuskel von C. tuberculatum ist in Tabelle 18 dargestellt. Die Ammoniumsulfatfällungen waren zwar mit einem hohen Aktivitätsverlust verbunden (35 - 45%), aber gleichzeitig wurden 92% des Proteins damit abgetrennt. In dem Sediment bzw. Überstand, der verworfen wurde, fanden sich nur minimale Dehydrogenaseaktivitäten. Daher scheint die Aktivität durch die Zerstörung der Proteinstruktur des Enzyms verloren gegangen zu sein.
Die Affinitätschromatographie wurde trotz eines hohen Aktivitätsverlusts und der folglich nur geringen weiteren Reinigung der AlDH/StDH-Präparation durchgeführt, um die restlichen Dehydrogenasen abzutrennen.
Die Methode des Chromatofocussing erwies sich als unbrauchbar, um die Pyruvatreduktasen aus C. tuberculatum zu trennen, da bei diesem Verfahren die Enzyme ODH und AlDH/StDH inaktiviert werden. In den endgültigen Präparaten der Dehydrogenasen waren die Aktivitäten etwa 100fach gegenüber dem Rohextrakt angereichert und hatten eine spezifische Aktivität von 7.62 U LDH II pro mg Protein, 192.5 U ODH I und 246.7 U LDH II pro mg Protein sowie 68.4 U AlDH/StDH I und 69.3 U AlDH/StDH II pro mg Protein.
Das Reinigungsverfahren ergab im Wesentlichen die gleichen Resultate bei Isolierung der Pyruvatreduktasen aus dem Schließmuskel von C. tuberculatum, lediglich der Anteil der AlDH/StDH I war im Schließmuskel geringer als im Fußmuskel.

3. Elektrophorese

Diese Methode wurde hauptsächlich eingesetzt, um zu untersuchen, ob AlDH und StDH unterschiedliche Enzymproteine sind. Wie die Darstellung in Abb. 15 (unten) zeigt, erhält man bei elektrophoretischer Auftrennung derjenigen Fraktionen, die nach dem DEAE-Schritt AlDH/StDH-Aktivität aufweisen, vier Banden, die sich sowohl bei der Inkubation mit Alanopin (AlDH) als auch bei der Inkubation mit Strombin (StDH) anfärben (r_f-Werte: 0.22, 0.285, 0.32 und 0.40).
Die Messung der Endprodukte nach biotopbedingter bzw. funktioneller Anaerobiose ergab, daß nur Alanopin, aber niemals Strombin gebildet wird (s. Teil B, III,1). Daher wird das zur Rede stehende Enzym im Folgenden nur noch als AlDH

bezeichnet.

Die elektrophoretische Trennung der LDH-haltigen Fraktionen nach Ionenaustauscherchromatographie ergab bei Anfärbung auf Aktivität, daß die niedermolekulare Form LDH II in zwei Isoenzymen existiert. Die hochmolekulare Form LDH I weist jedoch dasselbe Bandenmuster mit einer zusätzlichen schwachen Bande im der Nähe des Auftragungspunktes auf (r_f-Werte: 0.24, 0.37 und 0.43).

Die Trennung der ODH-haltigen Fraktionen ergab zwei gleich starke Banden mit den r_f-Werten 0.495 und 0.54.

Die endgültigen Präparationen der LDH, ODH und AlDH wiesen bei Anfärbung auf Protein noch schwache Banden neben den Hauptbanden auf, die den Proteinen der Pyruvatreduktasen entsprachen (nicht dargestellt). Die Enzyme waren demnach nicht bis zur Homogenität gereinigt, enthielten aber nur noch ca. 20% andere Proteine.

4. Bestimmung des Molekulargewichts

Die Abschätzung des Molekulargewichts der nativen Enzyme durch analytische Gelfiltration auf einer Sephadex G-100 Säule (Abb. 16) ergab folgende Werte: LDH I 115 - 120kDa, LDH II 55 - 59kDa, ODH I und II 45 - 49kDa, sowie AlDH I und II 41.5 - 45kDa (Abb. 17).

5. Die Auswirkungen des pH-Wertes auf die Enzymaktivität

Die pH-Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von LDH II, ODH I und II, bzw. AlDH I und II wurden bei den gleichen Substratkonzentrationen wie im Standardtest ermittelt, wobei Phosphatpuffer mit verschiedenen pH-Werten eingesetzt wurden. In der pyruvatreduzierenden Richtung der Reaktionen (Hinreaktion) lagen die pH-Optima bei pH 6.5 (LDH), pH 7.2 (ODH), pH 6.5 (AlDH mit Alanin) und pH 7.5 (AlDH mit Glycin). In der substratoxidierenden Richtung (Rückreaktion) waren die pH-Optima bei pH 8.5 (ODHs und AlDHs) bzw. pH 9.0 (LDH).

Die Untersuchungen der Substratspezifität und der kinetischen Eigenschaften der LDH, ODH und AlDH wurden bei pH 7.1 durchgeführt. Dieser pH-Wert ist den genannten pH-Optima nahe und ähnelt wahrscheinlich den intrazellulären Bedingungen nach biotopbedingter Anaerobiose (Ellington 1983, Pörtner *et al.* 1984). Für kinetische Untersuchungen der Rückreaktion wurde pH 8.4 gewählt, um die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen, die normalerweise nur ca.

Tabelle 19: Substrataffinität der gereinigten D-Lactatdehydrogenase (LDH II), Octopindehydrogenase (ODH II) und Alanopindehydrogenase (AlDH II). Die angegebenen Werte sind jeweils der Durchschnitt von Messungen mit zwei Enzympräparationen.

A. Spezifität für Oxocarboxylsäuren

Oxocaroboxyl-Säure (2.5 mM)	LDH II Aktivität %*	K_M(mM)	Hemmung %´	ODH II Aktivität %*	Hemmung %´	AlDH II Aktivität %*	K_M(mM)	Hemmung %´
Pyruvat	100	0.08	-	100	-	100	0.36	-
Glyoxylat	26	1.15	65	3	30	25	3.55	2
2-Oxobutyrat	20	3.0	13	12	23	58	2.56	
2-Oxovaleriat	0.7		6	0.5	32	8	5.58	
2-Oxocapronat	0		8	0	19	3		
2-Oxoisovaleriat	0		0	0	17	0		
2-Oxoisocapronat	0		0	0	0	0		
Oxalacetat	0		30	0.6	31	8		20
2-Oxoglutarat	0		11	0	23	1.5		22

* Relative Aktivität mit dem jeweils getesteten Substrat im Vergleich zur Aktivität mit 2.5 mM Pyruvat und 5 mM Arginin bzw. 100 mM Alanin (= 100%)
´ Inhibition dieser maximalen Aktivität durch die Oxocarboxylsäuren

Fortsetzung Tab. 19 auf der nächsten Seite

B. Aminosäurespezifität

Aminosäure	ODH II mM	ODH II % Aktivität´	AlDH II mM	AlDH II % Aktivität´
Aminosäuren mit lipophilen Resten:				
Glycin			100	76
L-Alanin			100	100
D-Alanin			100	3*
L-Valin			100	44
L-Leucin			100	0.5
L-Isoleucin			100	7
2-Aminobutyrat			100	88
Aminosäuren mit polaren Resten:				
L-Serin			100	45
L-Threonin			100	10
L-Cystein			100	93
L-Methionin			100	3
L-Asparagin	50	0	100	4
L-Glutamin	50	0	100	0.4
Aminosäuren mit sauren Resten:				
L-Asparagin			100	0
L-Glutamat			100	0
L-Creatinin			100	0
Taurin			100	0
Aminosäuren mit alkalischen Resten:				
L-Lysin	10	0	100	0
L-Ornithin	100	4	100	0.4
L-Arginin	10	100	100	0
L-Homoarginin	100	0	100	0.2
L-Citrullin	60	0	100	0
L-Creatin	60	0		
L-Canavanin	10	11		

´ Relative Aktivität der ODH II bzw. AlDH II mit der getesten Aminosäure im Vergleich zur Aktivität (=100%) mit 10 mM Arginin bzw. 100 mM Alanin bei 2.5 mM Pyruvat, pH 7.1.

* 16% Hemmung der Aktivität bei 100 mM L-Alanin

10% der Hinreaktion beträgt.

6. Substratspezifität

a) 2-Oxocarboxylsäuren

Acht verschiedene 2-Oxocarboxylsäuren wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit getestet, Pyruvat in der Hinreaktion der LDH, ODH bzw. AlDH zu ersetzen (Tabelle 19A). Im Vergleich zu der Umsetzung von Pyruvat ergeben kurze, geradekettige 2-Oxocarboxylsäuren wie 2-Oxobutyrat (LDH 20%, ODH 12%, AlDH 58%) und Glyoxylat (LDH 26%, ODH II 3%, AlDH II 25%) erkennbare Aktivitäten. Die Affinität zu diesen 2-Oxocarboxylsäuren war mehr als 14mal bzw. 7mal geringer als die entsprechnde Affinität zu Pyruvat.
Wurde Pyruvat zu einem Test gegeben, der eine der untersuchten 2-Oxocarboxylsäuren enthielt, so wurden keine maximalen Aktivitäten gemessen, da die Pyruvatumsetzung offensichtlich gehemmt war (Tabelle 19A). Besonders die 2-Oxocarboxylsäuren, die im vorhergehenden Versuch umgesetzt wurden, wirkten sich hemmend aus. Jedoch wurde beispielsweise die ODH II auch durch nicht reagierende Säuren gehemmt. Ebenso hemmten die Dicarboxylsäuren Oxalacetat und 2-Oxoglutarat, die nur von der AlDH II langsam umgesetzt werden können, die Aktivitäten aller Dehydrogenasen.

b) Aminosäuren

Es wurde versucht, die Aminosäure Arginin in der Hinreaktion der ODH durch acht andere Aminosäuren zu ersetzen, aber es stellt sich heraus, daß das Enzym offensichtlich sehr spezifisch für L-Arginin ist (Tabelle 19B).
Das Spektrum der Aminosäuren, die die AlDH mit Pyruvat kondensieren kann, ist jedoch sehr viel breiter: Mit abnehmender Präferenz werden Cystein, 2-Aminobutyrat, Glycin, Serin und Valin umgesetzt. Die Reaktionsgeschwindigkeit beträgt dabei mehr als 44% der Aktivität mit Alanin (100%).

7. Kinetische Parameter

Die Michaelis-Menten-Konstanten (apparente oder absolute K_M-Werte) wurden für nicht hemmende Konzentrationen aller Substrate der LDH, ODH bzw. AlDH ermittelt (Tabelle 20). Eine Substrathemmung trat erst bei mehr als 5 mM

Tabelle 20: Apparente und absolute (*) K_M-Werte für die Substrate der D-Lactatdehydrogenase, der Octopindehydrogenasen I und II und der Alanopindehydrogenasen I und II, die aus Fußgewebe von C. tuberculatum gereinigt wurden. Durch die Wertebereiche werden die differierenden Ergebnisse von zwei oder drei Bestimmungen und unterschiedliche Berechnungsweisen wiedergegeben. Die K_M-Werte wurden entsprechend Gleichung (1)´, Gleichung (2) oder Gleichung (3)" aus den Meßreihen errechnet (s. Material und Methoden).

Testbedingungen:	Substrat	K_M (mM)	
D-Lactatdehydrogenase:			
0.05 - 1.25 mM Pyruvat, 0.011 - 0.11 mM NADH, pH 7.1	NADH	0.0055 - 0.0096*	
	Pyruvat	0.047 - 0.080*	
1 - 50 mM D-Lactat, 0.05 - 1.0 mM NAD^+, pH 8.4	NAD^+	0.012 - 0.021*	
	D-Lactat	4.62 - 5.68*	
Octopindehydrogenase:		I	II
0.1 - 5 mM Pyruvat, 0.25 - 20 mM Arginin, 0.15 mM NADH, pH 7.1	Pyruvat	1.15 - 1.30	0.95 - 1.23
	Arginin	1.69 - 1.94	1.52 - 1.82
0.011 - 0.2 mM NADH, 20 mM Arginin, 2.5 mM Pyruvat, pH 7.1	NADH	0.046 - 0.048´	0.020 - 0.026´
1 - 10 mM Octopin, 0.1 - 2.5 mM NAD^+, pH 8.4	NAD^+	0.23 - 0.27"*	0.18 - 0.21*
	Octopin	1.14 - 2.44*	7.43 - 7.85*

Fortsetzung von **Tabelle 20:**

Alanopindehydrogenase:		I	II
0.125 - 2 mM Pyruvat, 6.25 - 75 mM Alanin oder 25 - 200 mM Glycin, 0.15 mM NADH, pH 7.1	Pyruvat (Ala)	0.36	
	Alanin	56.6	
	Glycin	194.7	
100 mM Alanin oder 200 mM Glycin, 0.15 mM NADH, pH 7.1	Pyruvat (Ala)	0.40 - 0.42´	0.37 - 0.38´
	Pyruvat (Gly)	1.03 - 1.08´	1.01 - 1.17´
2 mM Pyruvat oder 5 mM Pyruvat, 0.15 mM NADH, pH 7.1	Alanin	60.4 - 62.3´	68.6 - 69.7´
	Glycin	197.8 - 200.1´	205.6 - 208.9´
100 mM Alanin oder 200 mM Glycin, 2.5 mM Pyruvat, pH 7.1	NADH (Ala)	0.018 - 0.019´	0.008 - 0.009´
	NADH (Gly)	0.016 - 0.018´	0.007 - 0.009´
5 mM NAD^+, pH 8.4	Alanopin	1.19 - 1.31´	0.94 - 1.16´
	Strombin	15.2 - 17.8´	10.2 - 12.6´
2 mM Meso-Alanopin, pH 8.4, 10 mM D-Strombin	NAD^+ (Alo)	0.49 - 0.56´	0.41 - 0.44´
	NAD^+ (Str)	0.41 - 0.51´	0.33 - 0.35´

Pyruvat, 20 mM Arginin oder 200 mM Alanin auf.
Das Verfahren, die K_M-Werte für zwei Substrate gemäß Gleichung (3) gleichzeitig zu bestimmen, wurde nur für die AlDH I angewendet, weil die Präparationen von AlDH I und AlDH II sehr ähnliche kinetische Eigenschaften aufweisen, wenn man die apparenten K_M-Werte vergleicht, die für jedes Substrateinzeln nach Gleichung (1) ermittelt wurden (Tabelle 20).
Es wurden die gesamten Bereiche für die K_M-Werte angegeben, da sich geringe Unterschiede im Laufe wiederholter Bestimmungen und bei unterschiedlichen Berechnungen ergaben, bei denen die Rolle des jeweiligen Substrats in Gleichung (2) oder (3) als Substrat A oder B ausgetauscht wurde.
In Tabelle 20 sind nur K_M-Werte für die LDH II angegeben, weil die LDH I als ein inaktiver Zusammenschluß der LDH II angesehen wird (Carlsson und Gäde 1981). Bei der Messung der pyruvatreduzierenden Aktivität in der "LDH I" genannten Fraktion wurde eine Zunahme der Extinktionsänderung innerhalb der ersten Minuten nach Zugabe von Pyruvat (als Starter der Reaktion) beobachtet. Diese Beschleunigungsperiode kann durch die Zugabe von 0.2 mM D-Lactat zum Testansatz aufgehoben werden, während NAD^+ oder NADH keinen Einfluß darauf haben. Diese Aktivierung wird zwar bei der LDH II nicht vorgefunden, doch ist sie in weniger ausgeprägter Form auch im Rohextrakt von C. tuberculatum vorzufinden, der ein Gemisch von LDH I und LDH II darstellt. Innerhalb von 2 bis 3 Minuten nach dem Start nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit um 40% zu. Dieses Verhalten der LDH-Aktivität verändert sich auch in Extrakten von Muscheln nicht, die bis zu sechs Stunden anaeroben Verhältnissen ausgesetzt waren.
Der einzige offensichtliche Unterschied zwischen den Isoenzymen I und II der ODH besteht bezüglich der Affinität zu Octopin (ca. 2 mM bzw. etwa 7.5 mM).
Ist die Aminosäure Alanin der Reaktionspartner in der AlDH-Reaktion, so beträgt der K_M-Wert für Pyruvat 0.4 mM, ist es dagegen Glycin, so ist dieser Wert mehr als doppelt so hoch (ca. 1.1 mM). Die Affinität zu NADH oder NAD^+ wird aber nur wenig von dem Reaktionspartner beeinflußt. Ebenso wie der K_M-Wert für Alanin weniger als ein Drittel des Wertes für Glycin beträgt (app. K_M = 60.44 mM für Alanin und 200.1 mM für Glycin), so wird auch die Oxidation des Alanopins stark gegenüber der des Strombins begünstigt (app. K_M = 1.19 mM Alanopin bzw. 17.8 mM Strombin).

8. Hemmung der Enzymaktivitäten

Es wurde die Wirkung verschiedener Metabolite auf die pyruvatreduzierende

Tabelle 21: Hemmung der Aktivität der Pyruvatreduktasen aus Muskelgewebe von C. tuberculatum durch verschiedene Metabolite. Der jeweils aufgeführte Wert ist der Durchschitt zweier Messungen mit verschiedenen Enzympräparationen.

Inhibitor	Konzentration	Hemmung der maximalen Aktivität* von						
		LDH II		ODH II		AlDH I	AlDH II	
	(mM)		K_I(mM)		K_I(mM)			K_I(mM)
Citrat, Malat, Fumerat	10	-		-		-	0%	
D-Lactat	10	5%	21.5^{c}	4%		75%	88%	1.35^{n}
L-Lactat	10	0%		1.5%		41%	55%	4.8^{n}
Succinat	10	0%		0%		53%	65%	2.0^{n}
Propionat	1	0%		0%		61%	73%	0.23^{n}
Octopin	5	0%		77%	0.35^{c}	0%	0%	
Meso-Alanopin	2	0%		0%		-	65%	0.47^{m}
D-Strombin	10	0%		0%		-	17%	14.0^{m}
Argininphosphat	10	0%		7%		-	24%	
NAD^+	5	40%	0.35^{c}	80%	0.45^{m}	68%	70%	0.51^{c}
ATP	5	15%		7%		-	10%	
ADP	4	9%		0%		-	-	
AMP	1	-		0%			5%	

* Die maximale Aktivität wurde in 0.1 M K-Phosphatpuffer, pH 7.1, bei 0.15 mM NADH, 2.5 mM Pyruvat, sowie 5 mM Arginin oder 100 mM Alanin zur Messung der ODH- bzw. AlDH-Aktivität bestimmt.

^{c} kompetitive Hemmung bezüglich NADH bzw. Pyruvat;
^{m} gemischter Hemmtyp; ^{n} nicht-kompetetive Hemmung,
\- nicht gemessen

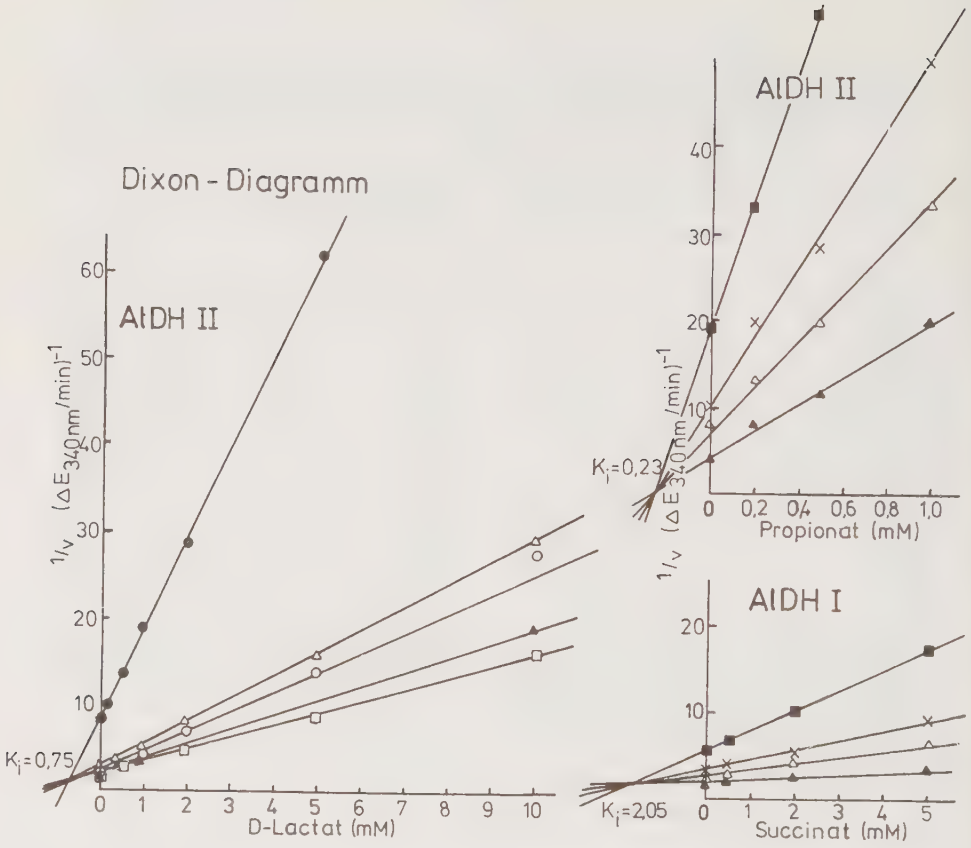

Abb. 18: Die Hemmung der AlDH-Aktivität durch D-lactat, Propionat und Succinat unter folgenden Bedingungen: 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.1), 0.15 mM NADH sowie 0.5 mM Pyruvat und 30 mM (■), bzw. 100 mM Alanin(△); 2 mM Pyruvat und 10 mM (●), 30 mM (x), 50 mM (○) oder 100 mM Alanin (▲) oder 5 mM Pyruvat und 100 mM Alanin (□), s. Tabelle 21.

Reaktion von LDH II, ODH II und AlDH II untersucht (Tabelle 21). Von den Metaboliten des Krebs-Zyklus hatten Citrat, Malat und Fumarat keinerlei Einfluß auf die Aktivitäten der Enzyme, während Oxalacetat und 2-Oxoglutarat hemmend wirkten (Tabelle 19A). Die Adenylate und das Argininphosphat verursachten nur eine geringfügige Hemmung.

Generell wurden alle Dehydrogenasen durch ihre Endprodukte gehemmt. Während jedoch die LDH-Aktivität nur durch hohe Konzentrationen ihrer Endprodukte D-Lactat und NAD^+ gehemmt wurde, war dies bei der ODH schon bei niedrigen Octopin- und NAD^+-Konzentration der Fall. Der Effekt von NAD^+ auf die AlDH-Aktivität war ausgeprägter als bei der LDH, aber schwächer als bei der ODH. Alanopin hemmte das Enzym bei vergleichsweise geringen, Strombin dagegen bei sehr hohen Konzentrationen.

Die AlDH ist die einzige Pyruvatreduktase aus C. tuberculatum, deren Aktivität außer von den Endprodukten auch von anderen Metaboliten beeinflußt wird. D-Lactat, L-Lactat, Succinat und Propionat, die häufig vorkommende Endprodukte des anaeroben Invertebratenstoffwechsels sind (siehe z.B. Gäde 1983), hatten deutlich hemmende Wirkung bei niedrigen Konzentrationen. In allen Fällen ist der Mechanismus der Hemmung nicht-kompetetiv (Abb. 18), d.h. der Modulator bindet nicht an das katalytische Zentrum des Enzyms.

9. Die apparenten Gleichgewichtskonstanten

Für die Hinreaktion der Pyruvatreduktasen aus C. tuberculatum wurden folgende apparente K_{eq}-Werte bei pH 7.0 bestimmt:

D-LDH: $7.35 \pm 3.24 \times 10^4$, ODH : $3.33 \pm 1.21 \times 10^5\ M^{-1}$,

AlDH : $1.00 \pm 0.60 \times 10^6\ M^{-1}$, StDH: $3.23 \pm 2.17 \times 10^7\ M^{-1}$.

Die Werte für die Reaktionen der LDH und ODH stimmen gut mit den Angaben von Lehninger (1975) bzw. Fields und Quinn (1981) überein. Für die Reaktionen der AlDH und StDH sind bisher keine K_{eq}-Werte veröffentlicht worden.

IV. Diskussion

1. Die Pyruvatreduktasen und ihre Eigenschaften

In C. tuberculatum sind vier Enzymaktiviäten vorhanden, deren einzige Funktion es theoretisch ist, die Redoxbilanz des anaeroben Stoffwechsels

auszugleichen. LDH, ODH, AlDH und StDH sind mit ca. 4 U, bzw. 120 U, 25 U und 22 U/g FG in den Muskelgeweben vorhanden und haben Pyruvat als gemeinsames Substrat, um NADH zu NAD^+ zu oxidieren, welches für den anaeroben Ablauf der Glykolyse benötigt wird.

Die Ionenaustauscherchromatographie und die Elektrophorese (Abb. 15) zeigen, daß nur drei Enzyme zu den vier Aktivitäten gehören: (1) LDH und (2) ODH, die jeweils in zwei Isoenzymen, sowie (3) AlDH, die in vier Isoenzymen vorkommt. Zur StDH-Aktivität gehört kein eigenständiges Enzym, vielmehr ist die AlDH in der Lage, auch diese Reaktion zu katalysieren.

Die Molekulargewichte der ODH und AlDH sind sich sehr ähnlich und liegen im Bereich von 41 bis 47kDa, wie es auch für alle Formen von ODH, AlDH und StDH aus anderen Tieren berichtet wird (s. Übersichtsartikel von de Zwaan und Dando 1984, Gäde und Grieshaber 1986).

Die LDH trat bei der Reinigung zum einen in einer Form mit einem Molekulargewicht von ca. 60kDa auf (LDH II), wie es für die dimere D-spezifische LDH üblich ist (s. Gäde und Grieshaber 1986). Andererseits wurde das Molekulargewicht einer zweiten Form (LDH I) mit ca. 120kDa bestimmt, das also doppelt so groß ist wie jenes der LDH II. Frühere Untersuchungen an der D-LDH in Geweben von C. edule (Carlsson und Gäde 1981) hatten neben der typischen Form von 70kDa eine weitere Form mit 240kDa gefunden.

Vermutlich ist die LDH I ein Komplex aus mehreren LDH II-Einheiten, wie es auch bei C. edule angenommen wird. Dieser Komplex ist möglicherweise im nativen Zustand inaktiv, worauf die zeitabhängige Aktivierung dieser LDH-Form hinweist. Es ist aber fraglich, ob die Regulation der Aktivität durch eine Umwandlung von inaktiver LDH I in aktive LDH II bzw. umgekehrt erfolgt. Es gibt keinerlei Anzeichen, daß ein durch sein Endprodukt D-Lactat selbst aktiviertes System der LDH von Bedeutung wäre, denn die D-Lactat-Bildung setzt sofort mit Beginn der biotopbedingten Anaerobiose ein. Ebenso führt nach anaerober Vorinkubation, während deren Verlauf die D-Lactat-Bildung schon eingestzt hat, Muskeltätigkeit nicht zu einer Erhöhung der D-Lactat-Menge (s. Abb. 14 in Teil D, Abschnitt IV). Die LDH wurde hier also nicht aktiviert, was auch der Umstand nahelegt, daß die LDH-Aktivität in den Rohextrakten anaerob inkubierter Muscheln noch die zeitabhängige Aktivierung aufweist.

Wie es auch bei den Pyruvatreduktasen anderer Tiere beobachtet wurde, kann Pyruvat in der Reaktion der LDH, ODH und AlDH durch ähnliche 2-Oxocarboxylsäuren ersetzt werden. Die Affinität zu diesen Säuren nimmt mit der Länge der Kohlenstoffketten ab, wie der steigende K_M-Wert, die abnehmende

Umsatzgeschwindigkeit und der abgeschwächte kompetetiv hemmende Effekt zeigen. Die hemmende Wirkung der Dicarboxylsäuren auf alle Pyruvatreduktasen deutet darauf hin, daß sie zwar an die Bindungsstellen der Enzyme gelangen, weil sie eine ähnliche Größe und Konfiguration wie das Pyruvat besitzen, aber die zweite Carboxyl-Gruppe eine Reaktion und/oder Kondensation verhindert.
Die Spezifität der AlDH aus C. tuberculatum unterscheidet sich von der vieler AlDH und StDH anderer Tiere (s. Gäde und Grieshaber 1986), die sowohl mit Pyruvat als auch Oxalacetat reagieren (Dando 1981, Fields und Hochachka 1981, Plaxton und Storey 1982, Storey 1983, Nicchitta und Ellington 1984). Betrachtet man die in C. tuberculatum gemessenen Konzentrationen der überprüften Carboxylsäuren (Tabelle 23 und 24 im Teil F, Abschnitt III), so kommt unter physiologischen Bedingungen nur Pyruvat als Substrat der LDH, ODH und AlDH in Frage, wobei keine bedeutende Inhibition dieser Aktivitäten zu erwarten ist.
Die Spezifität der ODH für guanidinhaltige Aminosäuren ist sehr ausgeprägt und fast ausschließlich auf L-Arginin beschränkt. Die ODH aus C. tuberculatum ähnelt somit der ODH aus den Muscheln Pecten jacobaeus, Anodonta cygnea und C. edule, sowie der ODH des Schnurwurms Cerebratulus lacteus (Gäde und Grieshaber 1975,1976; Gäde und Carlsson 1984). Die Aminosäure-Spezifität der AlDH unterscheidet sich vollkommen von der der ODH. Die L-Isomere kurzer Aminosäuren mit lipophilem oder polarem Rest reagieren mit der AlDH (Tabelle 19B). Lediglich Alanin dürfte allerdings von physiologischer Bedeutung für die Kondensationsreaktion der AlDH sein, da die Konzentrationen der übrigen Aminosäuren, überraschenderweise auch die des Glycin, in C. tuberculatum sehr gering sind (Tabelle 5 in Teil B, III, 3).
Die Aktivität aller Pyruvatreduktasen aus den Muskelgeweben von C. tuberculatum wird durch die Konzentrationen der Endprodukte D-Lactat, Octopin, Alanopin bzw. NAD^+ gehemmt. Aber nur die Aktivitäten der AlDH können zusätzlich durch andere Metabolite, nämlich häufig auftretende Endprodukte des anaeroben Stoffwechsel von Mollusken, beeinflußt werden. So hemmen D-Lactat und Succinat die Aktivität des Enzyms bei physiologischen Konzentrationen schon zu mehr als 50% (Tabelle 21). Interessanterweise war Propionat der wirksamste Inhibitor (K_I = 0.23 mM), obgleich dieser Metabolit nicht als Endprodukt bei Anaerobiose in C. tuberculatum nachzuweisen ist (s. Teil B, III, 1). Die Hemmung durch D-Lactat, dem Lactat-Isomer, das in der Herzmuschel vorkommt, war ausgeprägter als die durch das Stereoisomer L-Lactat (K_I = 1.35 bzw. 4.8 mM). Sie war in dem gleichen Konzentrations-Bereich wirksam, wie er auch in vivo vorgefunden wird (s. Tabelle 1 inb Teil B, III, 1). Dies gilt ebenfalls

für die Hemmung durch Succinat (K_I = 2.0 mM). Der Mechanismus der Hemmung wird als nicht-kompetetiv bezeichnet (Abb. 18), daher ist die inhibierende Wirkung auf die AlDH-Reaktion von den Konzentrationen der Substrate Alanin, Glycin oder Pyruvat unabhängig.
Für die StDH der Auster Crassostrea gigas wurde ebenfalls eine Hemmung ähnlichen Ausmaßes durch Succinat nachgewiesen (Fields und Hochachka 1981), ebenso wie z.B. L- und D-Lactat die AlDH und StDH der Seemaus Aphrodite acculeata hemmen (Storey 1983). Doch ist eine Aussage über eine eventuelle physiologische Bedeutung bei der letztgenannten Art nicht möglich, da noch keine Daten über die Anhäufung von Endprodukten bei Anaerobiose bekannt sind. In der Auster und der Seemaus ist der Hemmungsmechanismus kompetetiv bezüglich der Substrate Pyruvat, Alanin und/oder Glycin, wie man es auch auf Grund der Größe und Konfiguration der Inhibitormoleküle erwarten konnte.

2. Die Beeinflussung der Enzymaktivitäten durch die kinetischen Eigenschaften

Die kinetischen Eigenschaften der Isoenzyme AlDH I und AlDH II sind sich sehr ähnlich (Tabelle 20). Dies gilt auch für die Isoenzyme der ODH, die nur bezüglich der Octopinaffinität einen deutlichen Unterschied aufweisen. Da die Isoenzyme in Fuß und Schließmuskel etwa gleich verteilt sind, ist die Existenz gewebsspezifischer Isoenzyme der AlDH und ODH sehr unwahrscheinlich.
Die Affinität der drei Dehydrogenasen für das Cosubstrat NADH nimmt in der Reihenfolge LDH, AlDH, ODH ca. 2- bis 10fach, und für NAD^+ in der Reihenfolge LDH, ODH, AlDH ca. 15- bis 50fach ab (Tabelle 20). Die apparenten oder absoluten K_M-Werte für NAD^+ liegen für alle Enzyme im Bereich der NAD^+-Konzentration, die in dieser Muschel gemessen wurde (Tabellen 23 und 24 in Teil F, III, 1). Ob die verschiedenen K_M-Werte für NADH eine physiologische Signifikanz haben, kann nicht abgeschätzt werden, da der Gehalt an NADH in den Geweben bis heute gänzlich unbekannt ist.
Der absolute K_M-Wert der LDH für Pyruvat beträgt 0.08 mM, und ist damit gerade im Bereich der in vivo gemessenen Konzentrationen dieses Metabolits. Dahingegen liegen die apparenten K_M-Werte der ODH und AlDH für Pyruvat ca. 5- bis 10mal höher. Demzufolge hat die Steigerung der geringen Pyruvatkonzentrationen in vivo eine sehr viel deutlichere Beschleunigung der ODH- und AlDH-Reaktion zur Folge als bei der LDH-Reaktion. Verstärkt wird dieser Effekt noch dadurch, daß bei ODH und AlDH die Affinität zu den Aminosäuren mit der Pyruvatkonzentration zunimmt.

Betrachtet man die Reaktionsrichtung der Substratoxidation, so fällt auf, daß die K_M-Werte der LDH für D-Lactat, bzw. der ODH für Octopin, jeweils den Konzentrationen dieser Endprodukte nach ausgedehnter Anaerobiose oder erschöpfender Muskeltätigkeit ähneln (s. Teil B, III, 1 und C, III, 1). Verglichen mit LDH und ODH, haben die Isoenzyme der AlDH eine hohe Affinität zu ihrem Produkt Alanopin, während nur eine geringe Affinität für Strombin beobachtet wurde (Tabelle 20).

Eine Beziehung zwischen den K_M-Werten und der Gleichgewichtskonstanten der entsprechenden Reaktion kann man durch die Haldane-Gleichung herstellen (Alberty 1953). Nimmt man an, daß die übrigen Substrate in sättigenden Konzentrationen vorhanden sind und daß das Verhältnis der maximalen Geschwindigkeit der Hin- und Rückreaktion für alle Dehydrogenasen ähnlich ist, so kann man anhand des Verhältnisses des K_M-Wertes für Pyruvat und des K_M-Wertes für das entsprechende Endprodukt grob abschätzen, inwieweit das jeweilige Endprodukt unter Gleichgewichtsbedingungen angehäuft werden kann. Für die LDH liegt dieses Verhältnis bei 1/58 - 121; die entsprechenden Werte für ODH I und ODH II sind 1/1 -2.8 bzw. 1/6 - 8.2 und für die AlDH 1/2.5 - 2.8, wenn Alanopin und 1/16.5 - 34, wenn Strombin gebildet wird. Diesen Werten zufolge wäre die D-Lactat-Bildung aus Gründen des Gleichgewichts besonders begünstigt. Da die Bedingungen in vivo durch die Konzentrationen des NADH, NAD^+ und Pyruvat vorgegeben werden und für die Gleichgewichtslage der LDH-, ODH- oder AlDH-Reaktion identisch sind, sollten entsprechend unseren Berechnungen neben D-Lactat auch Strombin und kleine Mengen an Alanopin und Octopin angehäuft werden. Das setzte allerdings voraus, daß die Aminosäuren in sättigenden Konzentrationen vorliegen. Aber nur die Arginin-Konzentrationen in den Geweben von C. tuberculatum sind größer als der K_M-Wert der ODH für Arginin. Der Gehalt an Alanin beträgt dagegen nur 1/10 des apparenten K_M-Wertes der AlDH für Alanin und der Glycin-Gehalt liegt in vivo sogar nur bei 1/250 des entsprechenden K_M-Wertes.

Diese Unterschiede können vielleicht erklären, warum trotz der ausreichend hohen Affinität der AlDH für Pyruvat und NADH nur sehr geringe Mengen an Alanopin und kein Strombin gebildet werden, während unter den gleichen Bedingungen der biotopbedingten Anaerobiose hauptsächlich D-Lactat und geringe Mengen an Octopin als Endprodukte auftreten.

Auch die ermittelten apparenten K_{eq}-Werte für die Reaktionen der Pyruvatreduktasen bestätigen die Schlußfolgerung aus dem Vergleich der

kinetischen Daten: Bei gleichen Konzentrationen aller Aminosäuren sowie einheitlicher Bedingungen bezüglich der anderen Reaktionspartner wäre die Bildung von Strombin gegenüber der des Alanopins oder gar Octopins bevorteilt. Das Verhältnis der Opinbildung zur Lactatbildung hängt allein von den gegebenen Aminosäurekonzentraionen ab.

Die Beobachtung, daß bei funktioneller Anaerobiose Octopin, aber augenscheinlich kein D-Lactat gebildet wird, läßt sich nicht mit den Überlegungen in Einklang bringen, die wir hinsichtlich der Gleichgewichtsbedingungen angestellt hatten. Wie bereits an anderer Stelle diskutiert (s. Teil C, IV, 3), ist die Kapazität der LDH, Pyruvat umzusetzen, nur begrenzt, so daß eine vielfach erhöhte Glykolyse zu einer Erhöhung der Pyruvat- und NADH-Konzentrationen führt (Pyruvat-Stau). Unter diesen Umständen ist die ODH durch ihre große Kapazität in der Lage, eine rasche Bildung von Octopin zu katalysieren (s.o.). Wenn der LDH der für den Abbau des Pyruvat-Staus notwendige Zeitraum zur Verfügung stand, so wird auf Grund der veränderten Gleichgewichtslage das gebildete Octopin sogar unter anaeroben Bedingungen wieder oxidiert (s. Teil D, III, 7b). Dieser Befund belegt, daß die Bedingungen der Octopinbildung kein stabiler Gleichgewichtszustand sind.

F. Untersuchungen zur Regulation der Glykolyse bei C. tuberculatum während biotopbedingter und funktioneller Anaerobiose

I. Die Anpassung der Glykolyserate an die Erfordernisse der biotopbedingten und funktionellen Anaerobiose

Die Muschel C. tuberculatum reduziert während der biotopbedingten Anaerobiose ihren Energieverbrauch auf ca. 5% des aeroben Verbrauchs. Das Verhältnis von anaerober zu aerober Energieausbeute bei gleichem Glykolyseumsatz liegt aber bei mindestens 8% (s. Teil A,III,3). Daraus kann man ableiten, daß unter diesen Bedingungen der glykolytische Umsatz nicht erhöht wurde, sondern sogar reduziert worden sein muß.
Bei funktioneller Anaerobiose ist dagegen eine starke und kurzzeitige Steigerung der Glykolyserate zu beobachten (s. Teil C,IV,3). Dieser Anstieg wird auf die Wirkung der veränderten Adenylatkonzentrationen zurückgeführt (s. Teil A,IV,2). Aber auch bei anhaltender anaerober Inkubation sind entsprechende Veränderungen der Adenylatgehalte, ebenso wie vergleichbare Reduzierungen der Argininphosphatreserven, festzustellen.
Der vordergründige Unterschied zwischen Muskeltätigkeit und anaerober Inkubation scheint speziell in den Muskelgeweben darin zu bestehen, daß dort nur Octopin als glykolytisches Endprodukt auftritt während hier eine Vielfalt von Endprodukten des anaeroben Stoffwechsels (D-Lactat, Alanin und Succinat) gebildet wird.
Um nun eine Erklärung für die so unterschiedlich regulierte Glykolyse bei biotopbedingter und funktioneller Anaerobiose zu finden, wurden die Enzymaktivitäten aller glykolytischen Enzyme gemessen. Nach Rognstad (1979) ist die relativ geringe Aktivität ein Hinweis darauf, ob ein Enzym regulierendes Glied in einer Substratkette sein kann. In Ergänzung der bisher beschriebenen Untersuchungen der Veränderungen von Metabolitkonzentrationen wurden die Messungen der Aktivität auf alle Enzyme ausgedehnt, die Aussagen über die Kapazitäten der verschiedenen Wege des anaeroben Energiestoffwechsels liefern können.
Auf die Aktivitäten der glykolytischen Enzyme haben nicht nur die Adenylate und etwaige Endprodukte einen Einfluß, sondern auch die Konzentrationen intermediärer Metabolite der Glykolyse. Die fluorimetrischen Bestimmungen dieser Konzentrationen geben zum einen Aufschluß über die Veränderungen der Konzentration von regulierend wirkenden Metaboliten, zum anderen lassen sich

daraus für jeden Zwischenschritt der Glykolyse die Massenwirkungsquotienten (mass action ratio = MAR) berechnen. Der Vergleich des MAR mit der apparenten Gleichgewichtskonstanten (K_{eq}) der entsprechenden Reaktion zeigt auf, welche Schritte nahezu in Gleichgewichtslage ablaufen, und welche weit davon entfernt sind (Rollestone 1972). Zur Steuerung des Umsatzes einer Substratkette ist die Regulation der Enzyme, die eine solche "Nichtgleichgewichtsreaktion" katalysieren, besonders wirkungsvoll (Kacser und Burns 1973). Ob eine Regulation von Reaktionsschritten durch die Modulation der zugehörigen Enzymaktivität stattfindet, läßt sich anhand der Verschiebung des MAR unter verschiedenen physiologischen Bedingungen verfolgen.
Die Schlüsselenzyme bei der Regulation der Glykolyse, Phosphorylase, PFK und PK (siehe Teil A, Abschnitt IV), wurden in den entsalzten Rohextrakten von C. tuberculatum daraufhin untersucht, wie die Beeinflussung ihrer Aktivität durch bestimmte Metabolite erfolgt und ob sich während der Anaerobiose ihre Eigenschaften verändern.

II. Aufbau, Durchführung und Auswertung der Versuche

1. Versuchstiere

Die verwendeten Exemplare von C. tuberculatum wurden von September (22°C Wassertemperatur) bis November (16.5°C) 1981 und im September 1985 (22°C) durch die Fischer der Stazione Zoologica di Napoli, Italien, bezogen.

2. Chemikalien

Herkunft und Reinheit der verwendeten Substanzen und Enzyme entsprechen exakt den Angaben, die in den Teilen B,II,2 und E,II,2 gemacht worden sind.

3. Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau für die Simulierung der biotopbedingten Anaerobiose ist mit dem identisch, der in Teil B,II,3 beschrieben wurde; die Verfahrensweise zur Erzeugung funktioneller Anaerobiose ist bereits in Teil C,II,3 dargestellt worden.

4. Extraktbereitung für die Messungen der Enzymaktivitäten

Aus Muscheln, die in gut belüftetem Wasser gehalten worden waren, wurden Fuß, Schließmuskel und Kiemen herauspräpariert. Nach Abtupfen des anhaftenden Wassers wurden die Gewebe in kleine Stücke geschnitten und sofort im 5 bis 10fachen Volumen (w/v) eiskalten Kaliumphosphat-Puffers (50 mM, pH 7.6, mit 1 mM EDTA und 14 mM Mercaptoäthanol) mit einem Ultra-Turrax-Homogenisator zerkleinert. Zur Bestimung der Aktivitäten von CS, PEPCK, ICDH und HOADH wurde 50 mM Tris-Puffer, pH 7.6, mit 1 mM EDTA als Homogenisationsmedium verwendet, und für die Aktivität der Glykogenphosphorylase 50 mM TRA/KOH, pH 7.05, mit 5 mM EDTA und 20 mM NaF. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 30000xg wurde der Überstand über eine vorgefertigte Sephadex G-25 Säule gegeben, um niedermolekulare Substanzen von den Enzymproteinen abzutrennen. In dem entsalzten Eluat wurden direkt die Aktivitäten der verschiedenen Enzyme gemessen.

5. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der Aktivitäten erfolgte spektrophotometrisch anhand der Reduktion oder Oxidation von NADH bzw. NAD^+ bei 340 nm (einzige Ausnahme: CS bei 412 nm) und 25°C. Die Testansätze zur Bestimmung der verschiedenen Enzymaktivitäten hatten folgende Zusammensetzung (Endkonzentration im Test):
Phospho-argininkinase (AK, EC 2.7.3.3): 50 mM TRA, pH 7.6, 0.3 mM NADP, 50 mM Glucose, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ADP, 0.5 U/ml G6PDH und 1 U/ml HK, Start der Reaktion mit 5 mM Argininphosphat.
Glycogenphosphorylase (EC 2.4.1.1): (Ziegler et al. 1979) 50 mM TRA, pH 7.6, 5 mM Imidazol, 2 mM EDTA, 1.3 mM DTT, 1% Glycogen, 4 uM G-1,6-P, 0.45 mM NADP, 5 mM Mg-Acetat, 1 U/ml G6PDH, 6 U/ml PGlM, Start mit 40 mM KH_2PO_4 (Phosphorylase a-Aktivität) und 1.6 mM 5´AMP (gesamte Phosphorylase-Aktivität).
Phosphoglucomutase (PGlM, EC 2.7.5.1): 50 mM TRA, pH 7.6, 0.3 mM NADP, 1.7 mM $MgCl_2$, 4 uM G-1,6-P, 1 mM EDTA, 0.5 U/ml G6PDH, Start mit 2 mM Glucose-1-Phosphat.
Hexokinase (HK, EC 2.7.1.1): 50 mM TRA, pH 7.6, 0.3 mM NADP, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 0.5 U/ml G6PDH, Start mit 50 mM Glucose.
Phosphoglucoisomerase (PGI, EC 5.3.1.9): 50 mM TRA, pH 7.6, 0.3 mM NADP, 1 mM $MgCl_2$, 0.5 U/ml G6PDH, Start mit 1.5 mM Fructose-6-Phosphat.
Phosphofructokinase (PFK, EC 2.7.1.11): 50 mM TRA, pH 7.6, 0.15 mM NADH, 1 mM

ATP, 5 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 1 U/ml ALD, 0.2 U/ml G3PDH und 10 U/ml Triosephosphatisomerase, Start mit 2.5 mM Fructose-6-Phosphat.

Fructosediphosphatase (FBPase, EC 3.1.3.11): 50 mM Tris/HCl, 0.3 mM NADP, 50 mM KCl, 5 mM Mercaptoäthanol, 3 U/ml PGI und 0.5 U/ml G6PDH, Start mit 0.6 mM Fructosebisphosphat.

Fructosebisphosphat-Aldolase (ALD, EC 4.1.2.13): 50 mM TRA, pH 7.6, 0.15 mM NADH, 1 U/ml G3PDH und 7 U/ml TPI, Start mit 1.3 mM Fructosebisphosphat.

Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH, EC 1.2.1.12): 50 mM TRA, pH 7.6, 0.15 mM NADH, 1 mM ATP, 2 mM EDTA, 2 mM $MgSO_4$, 15 U/ml PGK, Start mit 12.5 mM Glycerat-3-Phosphat (G3P).

Phosphoglyceratkinase (PGK, EC 2.7.2.3): siehe GAPDH, PGK durch GAPDH ersetzt.

Phosphoglyceromutase (PGM, EC 2.7.5.3): 50 mM TRA, pH 7.6, 0.15 mM NADH, 0.4 mM ADP, 1 mM $MgCl_2$, 3 U/ml ENO, 9 U/ml LDH, 1.5 U/ml PK, Start mit 12.5 mM G3P.

Enolase (ENO, EC 4.2.1.40): siehe PGM, ohne ENO, Start mit 2.5 mM Gycerat-2-Phosphat.

Pyruvatkinase (PK, EC 2.7.1.40): 50 mM TRA, pH 7.6, 0.15 mM NADH, 2 mM ADP, 3 mM $MgSO_4$, 50 mM KCl, 9 U/ml LDH, Start mit 1 mM PEP.

D-Lactatdehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.28): 100 mM Kaliumphosphat- Puffer, pH 7.0, 0.15 mM NADH, Start mit 2.5 mM Pyruvat.

Octopindehydrogenase (ODH, EC 1.5.1.11): siehe LDH, plus 5 mM Arginin.

Alanopindehydrogenase (AlDH, EC 1.5.1.?): siehe LDH, plus 100 mM L-Alanin.

Strombindehydrogenase (StDH, EC 1.5.1.?): siehe LDH, plus 200 mM Glycin.

Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase (G3PDH, EC 1.1.1.8): 50 mM TRA, pH 7.6, 0.15 mM NADH, Start mit 0.5 mM Dihydroxyaceton-Phosphat.

Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49): 50 mM TRA, pH 7.6, 0.3 mM NADP, 7 mM ADP, Start mit 1 mM Glucose-6-Phosphat.

Glutamatdehydrogenase (GluDH, EC 1.4.1.2): 50 mM TRA, pH 7.6, 0.15 mM NADH, 200mM Ammoniumacetat, 1 mM ADP, 2 mM EDTA, Start mit 10 mM 2-Oxoglutarat.

Glutamat-Oxaloacetat-Transaminase (GOT, EC 2.6.1.1): 50 mM TRA, pH 7.6, 0.15 mM NADH, 10 mM Aspartat, 25 uM Pyridoxalphosphat, 7 U/ml MDH, Start mit 10 mM 2-Oxoglutarat.

Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT, EC 2.6.1.2): siehe GOT, Aspartat wurde durch 1 M Alanin ersetzt.

Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCk, EC 4.1.1.32) 100 mM Tris/HCl pH 7.6, 0.15 mM NADH, 1 mM Inosindiphosphat, 1.25 mM $MnCl_2$, 2 mM PEP, 7 U/ml MDH, Start mit 20 mM $NaHCO_3$.

"Malic enzyme" (NADP) (ME, EC 1.1.1.40): 50 mM TRA, pH 7.6, 0.3 mM NADP, 1 mM

$MgCl_2$, Start mit 1 mM Malat.
Citratsynthase (CS, EC 4.1.3.2): 50 mM Tris/HCl pH 8.1, 0.05 mM Acetyl-Coenzym A, 0.25 mM Dithionitrobenzolidin, Start mit 0.2 mM Oxalacetat.
Isocitratdehydrogenase (ICDH, EC 1.1.1.42): 50 mM TRA, pH 7.6, 0.3 mM NADP, 40 mM NaCl, Start mit 2.5 mM DL-Isocitrat.
Malatdehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37): 50 mM TRA, pH 7.6, 0.15 mM NADH, Start mit 0.5 mM Oxaloacetat.
3-Hydroxyacetyl-Coenzym A-Dehydrogenase (HOADH, EC 1.1.1.36): 100 mM Tris/HCl pH 7.6, 0.1 mM NADH, Start mit 0.05 mM Acetoacetyl-Coenzym A.

6. Extraktbereitung für fluorimetrische Messungen

Die Herstellung von Perchlorsäureextrakten aus dem gesamten Weichkörper von C. tuberculatum ist im entsprechenden Abschnitt des Teils B,II,5 beschrieben worden. Für die Extraktion des Fußmuskels und des gesamten Weichkörpers bei der Kontrollgruppe bei 16.5°C wurde für diese Untersuchungen allerdings eine andere Methode angewendet.
Die Gewebestücke wurden ebenfalls in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert. In einem gläsernen Zentrifugenröhrchen wurden auf 0.6 ml tiefgefrorene Perchlorsäure 300 bis 400 mg Gewebspulver gegeben. Nachdem diese Mischung bei -12°C (NaCl-Eis-Gemisch) aufgetaut worden war, wurde die exakte Gewebsmenge ausgewogen und dann 2.5 ml eiskalten Wassers hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde kurz homogenisiert (15 Sek.), zur optimalen Extraktion 10 bis 15 Minuten im Eisbad stehengelassen und anschließend für 20 Miuten bei 19000xg in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Pro 1 ml Überstand wurde dann mit 0.3 ml $KHCO_3$ neutralisiert und erneut zentrifugiert. In diesem Überstand wurden die Adenylate, Arginin, Argininphosphat, sowie die Intermediate der Glykolyse und des Krebs-Zyklus direkt gemessen. Die anderen Metabolite konnten aus eingefrorenen Extrakten bestimmt werden.

7. Bestimmung der Metabolitkonzentrationen

Die benutzten spektrophotometrischen Methoden zur Messung der Adenylate, der Arginin-Derivate und der verschiedenen Endprodukte des anaeroben Stoffwechsels sind in Teil B, Abschnitt II,7 beschrieben worden.
Bei der fluorimetrischen Bestimmung der intermediären Metabolite der Glykolyse und des Krebs-Zyklus wurde exakt nach den Angaben von Lowry und Passonneau

(1972) verfahren. Benutzt wurde ein Fluorometer A4 der Fa. Farrand Optical Co. Inc. (New Rork, U.S.A.), dem ein Schreiber (Servogor 120, BBC Goerz Metrawatt) angeschlossen war, um die Fluoreszenz des NADH bei 465 nm aufzuzeichnen, welche nach einer Anregung des NADH durch Licht mit einer Wellenlänge von 340 nm auftritt.

8. Bestimmung des Aktivierungszustandes der Glykogenphosphorylase

Da bei der oben (s. Teil F,II,4) angegebenen Extraktionsmethode keine AMP-abhängige Aktivität der Phosphorylase "b" festgestellt werden konnte, mußten die Art der Gewebeentnahme und das Extraktionsverfahren verändert werden. Die Fußmuskeln der Ruhetiere, die sich zwei Stunden in einem kleinen Becken akklimatisiert hatten, und der Muscheln, die danach zur Ausführung von einigen Fluchtbewegungen veranlaßt (Sprünge) oder 2 bzw. 6 Std. anaerob inkubiert wurden, wurden innerhalb von 3 Sekunden nach Durchtrennen der Schließmuskeln zwischen den Backen einer stickstoffgekühlten Zange eingefroren ("freeze clamping"). Die Gewebsstücke wurden dann unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff gemörsert und das Gewebspulver bei - 9°C im 5- bis 10fachen Volumen (w/v) 66 mM TRA/KOH-Puffers, pH 7.05, mit 6.7 mM EDTA, 13.3 mM NaF, 0.6 mM Dithiotreiothol und 33% Glycerin aufgetaut und homogenisiert. In dem Überstand nach Zentrifugation des Homogenats konnten nach der Methode von Ziegler et al. (1979) die Aktivitäten der Phosphorylasen "a" und "b" gemessen werden (s. Teil F,II,5.).

9. Untersuchung der kinetischen Eigenschaften von PFK und PK

Es wurden Extrakte von Fuß-, Schließmuskel-, Kiemen- und Hepatopankreasgewebe im 5fachen Volumen eiskalten 66 mM TRA/KOH-Puffers, pH 7.05, mit 6.7 mM EDTA, 13.3 mM NaF, 0.6 mM Dithiotreiothol und 33% Glycerin hergestellt. Die kinetischen Untersuchungen wurden in dem oben angegebenen Testsystem (s. Teil F,II,5) bei pH 7.2 durchgeführt, wobei die Konzentration des Fructose-6-Phosphats (PFK) bzw des Pyruvats (PK) variiert und bekannte Effektoren dieser Reaktionen hinzugefügt wurden.
PFK und PK sind allosterisch regulierte Enzyme und ihr Reaktionsverhalten entspricht nicht dem einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die Substratkonzentration halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit $S_{0.5}$, die dem K_M-Wert entspricht, und der Hill-Koeffizient (h), der ein Maß für die Kooperativität der

Tabelle 22: Aktivitäten von Enzymen des Energiestoffwechsels in Fuß-, Schließmuskel- und Kiemengewebe von C. tuberculatum . Die spezifische Aktivität ist in µMol Substratumsatz pro Minute und pro g Frischgewicht angegeben als Mittelwert (mit Standardabweichung) von Messungen in 4 bzw. 3 (*) Tieren.

Enzym	Enzymaktivität		
	Fußmuskel	Schließmuskel	Kiemen
Phosphoargininkinase*	416 ± 50	575 ± 124	32.8 ± 9.5
Hexokinase	0.13 ± 0.07	0.32 ± 0.11	1.16 ± 0.07
Glykogenphosphorylase	3.34 ± 0.95	2.62 ± 0.77	1.22 ± 0.29
Phosphoglucomutase	12.22 ± 3.03	10.70 ± 1.00	3.46 ± 0.66
Glucosephosphatisomerase	42.96 ± 4.55	49.47 ± 6.57	49.23 ± 11.89
Phosphofructokinase*	4.60 ± 0.94	12.81 ± 4.54	1.07 ± 0.29
Fructosediphosphatase	0.03 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.75 ± 0.18
Aldolase	15.72 ± 6.68	17.42 ± 7.22	1.45 ± 0.53
Triosephosphatisomerase			
Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase	42.20 ± 5.93	42.57 ± 9.66	4.15 ± 0.83
Phosphoglyceratkinase	13.99 ± 5.96	15.68 ± 6.59	4.50 ± 0.90
Phosphoglyceromutase	73.68 ± 14.97	51.24 ± 17.82	10.11 ± 1.98
Enolase	16.28 ± 2.36	15.77 ± 2.85	2.82 ± 0.58
Pyruvatkinase	40.41 ± 10.44	63.71 ± 20.02	12.53 ± 1.36
Lactatdehydrogenase	3.98 ± 0.70	3.17 ± 0.49	5.05 ± 0.20
Octopindehydrogenase	117.22 ± 37.09	153.00 ± 32.92	2.95 ± 0.31
Alanopindehydrogenase	21.52 ± 3.84	40.85 ± 11.32	1.04 ± 0.69
Strombindehydrogenase	18.08 ± 3.11	33.53 ± 7.65	0.91 ± 0.35
Glycerophosphatdehydrogenase	0.68 ± 0.32	0.65 ± 0.12	0.55 ± 0.20
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	0.03 ± 0.03	0.05 ± 0.04	15.36 ± 3.00
Glutamatdehydrogenase	0.96 ± 0.28	0.80 ± 0.13	1,46 ± 0.30
Glutamat-Oxaloacetat-Transaminase	10.11 ± 2.20	6.90 ± 0.76	6.58 ± 0.69
Glutamat-Pyruvat-Transaminase	1.37 ± 0.43	1.15 ± 0.38	1.33 ± 0.24
Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	0.08 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.03
"Malic enzyme" (NADP)	< 0.02	< 0.02	0.40 ± 0.11
Citratsynthase	0.40 ± 0.19	0.28 ± 0.12	1.28 ± 0.75
Isocitratdehydrogenase	0.12 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.28 ± 0.02
Malatdehydrogenase	31.03 ± 6.66	37.62 ± 5.92	72.56 ± 13.62
Hydroxyacetyl-Coenzym A-Dehydrogenase	0.20 ± 0.06	0.16 ± 0.05	0.72 ± 0.23

Enzymuntereinheiten darstellt, wurden daher für die verschiedenen Bedingungen aus der Auftragung von log v/(V - v) gegen log A im sog. Hill-Diagramm entsprechend der Gleichung (1) ermittelt.

$$\log v/(V - v) = h \log A - \log K \qquad (1)$$

V ist die relative maximale Reaktionsgeschwindigkeit, A die Konzentration des Substrats A und h der Hill-Koeffizient.

III. Ergebnisse

1. Enzymaktivitäten

Die Aktivitäten der am Energiestoffwechsel beteiligten Enzyme sind für Fuß, Schließmuskel und Kiemen von C. tuberculatum gemessen worden und in Tabelle 22 dargestellt. Diese Gewebe repräsentieren einen Anteil von 19%, 9% bzw. 3% am gesamten Frischgewicht des Weichkörpers der Muschel. Die hohen Aktivitäten der glykolytischen Enzyme, der Argininkinase und der Glykogenphosphorylase sind Ausdruck der großen Kapazität der Muskelgewebe zur anaeroben Energieerzeugung. In Tabelle 22 ist nur die Aktivität der Phosphorylase "a" plus "b" dargestellt. Der Anteil von Phosphorylase "a" und Phosphorylase "b" an der Gesamtaktivität wurde für die verschiedenen physiologischen Situationen gesondert untersucht (s.u.).

In allen untersuchten Geweben war das Enzym PFK, ein Schlüsselenzym bei der Regulation der Glykolyse, mit der niedrigsten Aktivität aller glykolytischer Enzyme vertreten, während die PK, ein anderes regulatorisches Enzym, in 5- bis 10mal höheren Aktivitäten auftrat.

Die drei Pyruvatreduktasen LDH, ODH und AlDH, die als terminale Dehydrogenasen der Glykolyse dienen, waren in allen Geweben nachweisbar. Die LDH war in den drei untersuchten Gewebe mit 3 bis 5 U/g FG vertreten. Die Aktivitäten der ODH waren in den Muskelgeweben und besonders im Schließmuskel (153 U/g FG) sehr hoch, dagegen in den Kiemen nur in sehr geringen Aktivitäten (3 U/g FG) meßbar. Entsprechend verteilten sich die Aktivitäten der AlDH auf die Gewebe: Bemerkenswerte Aktivität in Schließmuskel (40 U/g FG) und Fuß (21.5 U/g FG), aber nur ca. 1 U/gFG in den Kiemen. In allen Geweben betrug die pyruvatreduzierende Aktivität der AlDH mit Glycin als Substrat nur ca. 90% der Aktivität dieses Enzyms mit Alanin.

Die Enzyme GluDH, GOT und GPT, die an der Umsetzung von Aminosäuren beteiligt sind, waren in allen Geweben vorhanden. Die Aktivitäten der GOT und GPT traten in den Muskelgeweben im typischen Verhältnis von ca. 10:1 auf (s. de Zwaan 1977).
Das Indikatorenzym des Glykogen/Succinat-Stoffwechselweges, die PEPCK tritt bei C. tuberculatum generell nur mit der geringen Aktivität von 0.1 U/g FG auf. Das "malic enzyme", das die Bildung von Pyruvat aus Oxalacetat und letztlich Aspartat ermöglichen kann, fehlt in den Muskelgeweben, ist aber in den Kiemen vorhanden. Auffällig ist die hohe Aktivität der G6PDH in den Kiemen, einem Enzym des oxidativen Abbaus von Glukose-6-phosphat zu Pentosephosphaten. Auch die FBPase, ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese ist nur in den Kiemen in nennenswerten Aktivitäten vorhanden.
Die Enzyme des Krebs-Zyklus, MDH, CS und ICDH, konnten mit 72.6 U MDH, 1.23 U CS und 0.28 U ICDH/g FG in den Kiemen gemessen werden, in den Muskelgeweben war dagegen weniger als die Hälfte dieser Aktivitäten festzustellen. HOADH, ein wichtiges Enzym der ß-Oxidation von Fettsäuren, ist in den Kiemen 4mal so aktiv wie in den Muskelgeweben.

2. Fluorimetrische Messungen

Die Konzentrationen der intermediären Metabolite der Glykolyse und des Krebs-Zyklus wurden zum einen in Extrakten aus dem gesamten Weichkörper der Muschel und zum anderen vom Fußgewebe, das die Muskelgewebe repräsentiert, gemessen. An den Messungen in Weichkörperextrakten wurde einerseits der jahreszeitliche Unterschied (Mai bzw. September) untersucht. Andererseits sollte festgestellt werden, ob sich gravierende Differenzen zum Fußmuskel bezüglich der Konzentrationen der intermediären Metabolite und bezüglich deren Änderungen bei biotopbedingter und funktioneller Anaerobiose ergeben. Aus etwaigen Unterschieden läßt sich ableiten, ob in den Nichtmuskelgeweben andere Bedingungen hinsichtlich der Ausgangskonzentrationen und der Reaktion auf anaerobe Bedingungen vorliegen.

a) Gesamter Weichkörper

aa) biotopbedingte Anaerobiose

Nach 10 Std. der anaeroben Inkubation (bei 22°C) sind bei den Metaboliten der

Tabelle 23: Konzentrationen der Glykolysezwischenprodukte, der Metabolite des Krebs-Zyklus und der Endprodukte des anaeroben Energiestoffwechsels im gesamten Weichkörper. Angegeben ist der Mittelwert mit einer Standardabweichung aus den Werten von drei bzw. vier (#) Tieren

Metabolit	aerobe Kontrollen 18°C	aerobe Kontrollen 22°C	10 Std. Anoxie 22°C	32 Sprünge[$#] 22°C
		(nMol/g FG)		
Glucose	283.0 ± 46.4	396.8 ±185.4	202.2 ± 37.1	364.5 ± 8.5
G-1-P	20.6 ± 4.1	46.5 ± 10.0	92.6 ± 25.2*	95.8 ± 29.0*
G-6-P	287.0 ± 54.7	339.3 ± 70.1	778.9 ±114.5*	897.4 ±225.4*
F-6-P	32.6 ± 3.9	70.4 ± 19.3	106.2 ± 31.0	98.1 ± 25.4
FBP	43.9 ± 4.2	156.9 ± 43.9	85.6 ± 22.1	182.0 ± 52.7
GAP	6.3 ± 1.9	6.8 ± 1.3	9.2 ± 3.7	16.1 ± 1.6*
DAP	9.1 ± 2.6	13.2 ± 0.5	24.1 ± 12.4	34.6 ± 4.0*
3-PG	13.4 ± 5.4	79.6 ± 11.7	136.3 ± 33.2*	150.4 ± 26.4*
2-PG	8.3 ± 0.6	6.8 ± 5.3	34.5 ± 16.9	15.3 ± 2.4
PEP	4.9 ± 0.6	4.2 ± 0.5	39.8 ± 15.2*	8.8 ± 2.2*
Pyruvat	51.4 ± 9.3	65.2 ± 17.1	57.8 ± 35.1	76.2 ± 11.2
Citrat	12.7 ± 1.8	-	-	-
Isocitrat	4.3 ± 1.2	-	-	-
2-Oxoglut.	9.0 ± 3.2	-	-	-
Succinat	170 ± 40	295 ± 110	1247 ± 74*	-
Fumarat	26.7 ± 7.6	-	-	-
Malat	136.2 ± 10.6	-	-	-
NAD^+	55.4 ± 4.4	54.9 ± 5.5	126.3 ± 71.5	163.8 ± 45.0*
		(µMol/g FG)		
D-Lactat	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.04	3.43 ± 1.07*	0.05 ± 0.01
Octopin	0.22 ± 0.04	0.27 ± 0.02	0.60 ± 0.12*	1.93 ± 0.42*
Alanin	2.26 ± 0.69	2.25 ± 1.00	4.48 ± 1.12*	-
Aspartat	4.20 ± 0.13	5.32 ± 0.33	1.49 ± 0.82*	-
Glutamat	3.43 ± 0.93	2.66 ± 0.23	-	-
Arginin	5.21 ± 0.27	8.39 ± 2.17	15.36 ± 2.25*	13.54 ± 1.53*
Arginin-phosphat	8.12 ± 2.23	11.05 ± 0.93	5.59 ± 1.71*	8.99 ± 2.69
ATP	2.78 ± 0.42	3.83 ± 0.66	3.85 ± 0.63	3.34 ± 0.30
ADP	0.58 ± 0.07	0.82 ± 0.02	1.06 ± 0.14*	1.21 ± 0.09*
AMP	0.13 ± 0.04	0.18 ± 0.09	0.39 ± 0.10	0.29 ± 0.05
"energy charge"	0.88 ± 0.01	0.88 ± 0.01	0.82 ± 0.03*	0.81 ± 0.01*

[$] 32 ± 4 Sprünge in 88 ± 24 Sekunden
- nicht gemessen
*Signifikanter Unterschied ($p>0.05$) zur KONTROLLGRUPPE

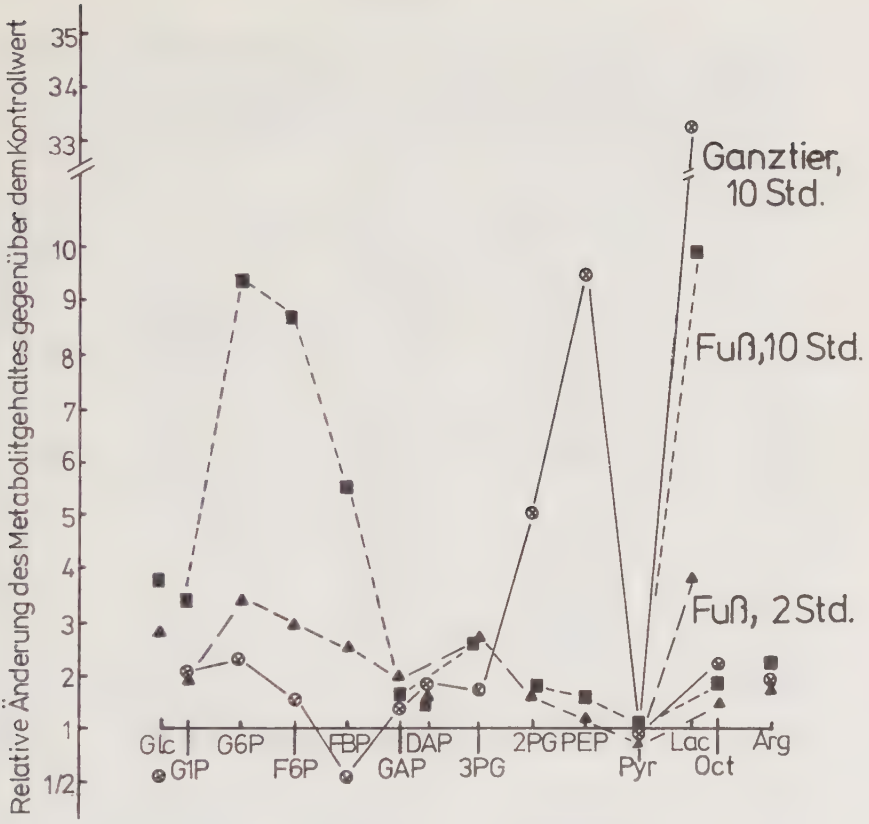

Abb. 19: Die relative Änderung der Konzentrationen der Zwischen- und Endprodukte der Glykolyse in Ganztier und Fußmuskel gegenüber den aeroben Kontrolltieren (Tab. 23) bei biotopbedingter Anaerobiose, sog. "cross over plots".

Tabelle 24: Konzentrationen der Metabolite der Glykolyse und des Krebs-Zyklus sowie der Endprodukte des anaeroben Energiestoffwechsels im Fußgewebe. Es sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus den Werten von drei bzw. vier (#) Tieren gebildet worden. Die Wassertemperatur betrug bei diesen Versuchsreihen 16.5°C.

A Biotopbedingte Anaerobiose

Metabolit	aerobe Kontrolle	2 Std. Anoxie	10 Std. Anoxie
		(nMol/g FG)	
Glucose	295.9 ±134.3	841.6 ±423.8	1122.4 ±465.9*
G-1-P	11.3 ± 4.9	21.4 ± 5.1*	38.6 ± 19.9*
G-6-P	98.9 ± 46.7	335.4 ± 79.3*	927.6 ±180.6*
F-6-P	12.1 ± 0.2	35.6 ± 2.2*	105.5 ± 10.5*
FBP	17.8 ± 8.9	44.3 ± 12.4*	98.0 ± 26.2*
GAP	2.2	4.3	3.6
DAP	5.9	9.4	8.6
3-PG	18.6	49.7	48.6
2-PG	5.7 ± 2.4	9.2 ± 2.7	9.8 ± 1.7
PEP	6.4 ± 2.3	7.3 ± 2.9	9.9 ± 3.3
Pyruvat	38.6 ± 5.0	30.5 ± 7.2	38.9 ± 12.3
Oxalacetat	3.5	2.1	0.6
Citrat	9.6	10.2	10.9
Isocitrat	5.1	2.7	5.0
2-Oxoglutarat	12.5	13.6	9.0
Succinat	30 ± 30	180 ± 110	560 ± 145*
Fumarat	5.1 ± 1.0	9.6 ± 1.3*	7.8 ± 1.2*
Malat	29.1 ± 11.0	50.0 ± 4.0*	95.0 ± 17.3*
NAD^+	155.9 ± 18.2	191.1 ± 11.3	230.0 ± 24.1*
		(µMol/g FG)	
D-Lactat	0.16 ± 0.06	0.62 ± 0.30	1.62 ± 0.81*
Octopin	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.06
Alanin	2.73 ± 0.94	4.01 ± 0.71	5.06 ± 1.05*
Aspartat	3.84 ± 1.15	2.87 ± 0.91	3.56 ± 1.60
Glutamat	2.50 ± 0.51	2.97 ± 1.06	3.37 ± 1.84
Arginin	5.01 ± 0.67	8.92 ± 0.37*	11.10 ± 0.53*
Arginin-phosphat	19.54 ± 1.58	17.23 ± 1.54	15.62 ± 0.54*
ATP	4.70 ± 0.55	4.92 ± 0.71	5.02 ± 0.46
ADP	0.65 ± 0.02	0.71 ± 0.05	0.75 ± 0.06*
AMP	0.13 ± 0.08	0.16 ± 0.07	0.13 ± 0.06
"energy charge"	0.92 ± 0.01	0.91 ± 0.02	0.91 ± 0.01
Phosphat	4.67 ± 0.18	7.32 ± 1.11*	8.52 ± 1.53*

Fortsetzung von **Tabelle 24:**

B. Funktionelle Anaerobiose

Metabolit	15 Sprünge´#	29 Sprünge"#	41 Sprünge"´
		(nMol/g FG)	
Glucose	361.6 ±114.4	362.8 ± 29.1	424.3 ± 13.4
G-1-P	33.0 ± 14.2	53.8 ± 17.5*	149.7 ± 49.8*
G-6-P	482.6 ±110.5*	720.9 ±217.1*	926.5 ± 50.1*
F-6-P	55.9 ± 9.3*	92.1 ± 24.8*	100.3 ± 17.0*
FBP	172.8 ± 42.2*	313.5 ± 94.6*	688.6 ± 30.8*
GAP	11.1 ± 5.2	5.6	-
DAP	13.1 ± 4.9	7.1	-
3-PG	-	-	-
2-PG	14.0 ± 5.8	18.7 ± 3.0*	25.6 ± 2.4*
PEP	5.8 ± 2.6	11.9 ± 1.2*	10.7 ± 2.9
Pyruvat	36.0 ± 12.3	89.0 ± 42.0	73.9 ± 15.3*
NAD+	208.4 ± 34.8	227.4 ± 31.8*	248.9 ± 18.4*
		(µMol/g FG)	
D-Lactat	<0.05	<0.05	<0.05
Octopin	0.83 ± 0.41	1.38 ± 0.71*	3.14 ± 0.79*
Arginin	14.63 ± 2.17*	17.76 ± 1.25*	26.73 ± 1.35*
Arginin-phosphat	16.84 ± 2.24	11.97 ± 2.66*	5.73 ± 2.72*
ATP	4.72 ± 0.10	4.93 ± 0.13	4.20 ± 0.40
ADP	1.06 ± 0.21*	1.09 ± 0.21*	1.56 ± 0.27*
AMP	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.44 ± 0.19*
"energy charge"	0.89 ± 0.02	0.89 ± 0.02	0.80 ± 0.05*

´ 15 ± 3 Sprünge in 23 ± 5 Sekunden
" 29 ± 4 Sprünge in 59 ± 17 Sekunden
"´ 41 ± 2 Sprünge in 113 ± 12 Sekunden
- nicht gemessen
* Signifikanter Unterschied (p>0.05) zur Kontrollgruppe

Glykolyse die Konzentrationen der Hexosen gegenüber den Kontrolltieren in etwa verdoppelt (Abb. 19). Eine Ausnahme bildet das FBP, dessen Konzentration um 45% gesunken ist. Bei den Triosen sind alle Konzentrationen nur leicht erhöht, aber deutliche Steigerungen sind bei den Konzentrationen des 2-PG und des PEP zu beobachten. Die Verdoppelung des NAD^+-Gehalts ist nicht signifikant (Tabelle 23).

bb) funktionelle Anaerobiose

Werden die Konzentration der Glykolysemetabolite nach durchschnittlich 32 Fluchtbewegungen gemessen, so stellt sich heraus, daß sich diese gegenüber den Werten in den Ruhetieren verdoppelt haben. Dies trifft jedoch nicht für die Metabolite FBP und Pyruvat zu, die nur geringfügig erhöht sind (Tabelle 23).

cc) aerobe Kontrolltiere von Mai und September

Beim Vergleich der in Tabelle 23 aufgeführten Meßwerte für Kontrolltiere vom Mai (18°C Wassertemperatur) mit denen vom September (22°C) findet man bei höherer Temperatur auch durchgehend höhere Konzentrationen für alle Metabolite der Glykolyse. Die Messungen der Metabolite des Krebs-Zyklus in den aeroben Ruhetieren vom Mai ergaben, daß deren Gehalt in C. tuberculatum sehr niedrig ist. Bei ihrer Bestimmung stößt man an die Nachweisgrenze der verwendeten fluorimetrischen Methoden, entsprechendes gilt auch für einige Triosen der Glykolyse.

b) Fußmuskel

aa) biotopbedingte Anaerobiose

Im Fußgewebe (Tabelle 24 und Abb. 19) nehmen die Hexose-Konzentrationen innerhalb von 10 Std. anaerober Inkubation bis zum 10fachen des Ruhewertes zu. Schon 2 Std. der Inkubation führen etwa 50% dieser Veränderung herbei. Da sich die Konzentrationen der Triosen allgemein nur wenig ändern, fällt die Erhöhung des 3-Phosphoglycerats um das ca. 2.5fache besonders auf.
Die Konzentrationen von Oxalacetat, Isocitrat, Citrat, 2-Oxoglutarat und Fumerat, alles Metabolite des Krebs-Zyklus, sind sehr niedrig ($\leq$ 10 nMol/g FG). Da sich keine drastischen Änderungen der Konzentrationen dieser Metabolite

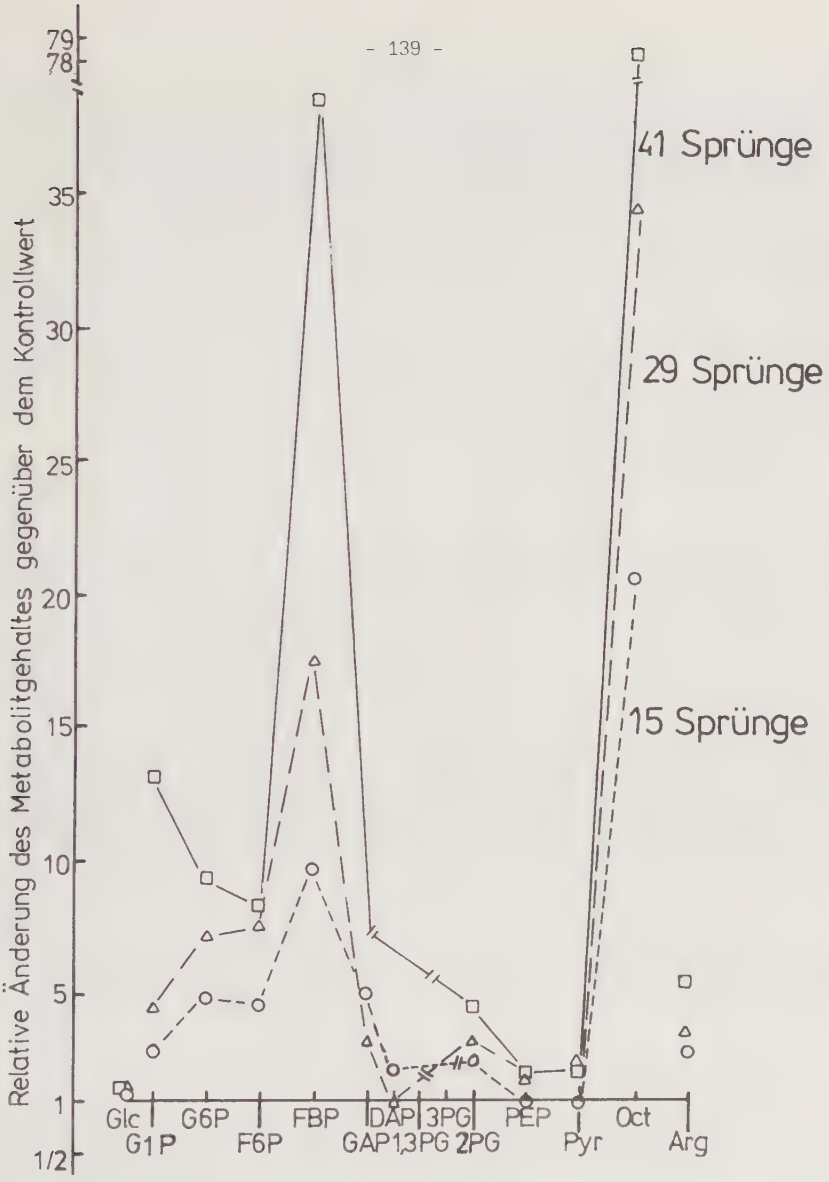

Abb. 20: Die relative Änderung der Konzentrationen der Zwischen- und Endprodukte der Glykolyse im Fußmuskel von C. tuberculatum bei verschieden intensiver Muskeltätigkeit gegenüber der aeroben Kontrollgruppe (Tab.24).

abzeichneten, wurden sie nicht näher untersucht (Tabelle 24). Für die Metabolite Malat und Succinat wurde eine Erhöhung des Gehalts von ca. 29 auf 95 nMol/g FG bzw. von 30 auf 560 nMol/g FG gemessen.
Als Besonderheit dieser Versuchsreihe fällt auf, daß nach 10 Std. der anaeroben Inkubation kein signifikanter Abbau von Aspartat nachzuweisen ist und daß die Anhäufung von Alanin in den ersten beiden Stunden der Inkubation größer ist als in den nachfolgenden acht Stunden (s. Teil B,III,1). Die relative Änderung der D-Lactat-Konzentration ist neben der des Succinat-Gehalts von allen Endprodukten am größten (ca. 10fache Zunahme).
Im Fuß ist der Anstieg der NAD^+-Konzentration nach anaerober Inkubation signifikant.

bb) funktionelle Anaerobiose

Die Veränderungen der Glykolysemetabolite, speziell der Hexosephosphate und der Triosen 2-PG, PEP und Pyruvat, sind in drei Gruppen verschieden intensiver Muskeltätigkeit, gemessen an der Anzahl der ausgeführten Fluchtbewegungen, zusammengefaßt (Tabelle 24B). Die Konzentrationen aller Glykolysemetabolite sind erhöht, wobei die Hexosen eine starke Konzentrationszunahme in Abhängigkeit von der Anzahl der Sprünge aufweisen (Abb. 20). Dieses Phänomen ist besonders deutlich bei G-1-P, dem primären Abbauprodukt des Glykogens, und bei FBP, dem Produkt der PFK-Reaktion. Die Konzentrationen des Substrats und des Produkts der PK-Reaktion, PEP bzw. Pyruvat, sind nach mehr als 29 Sprüngen einheitlich verdoppelt. Die bis zu 80fache Zunahme der Octopinkonzentration ist die größte relative Veränderung, die bei allen untersuchten Metaboliten festgestellt wurde. Bei den Adenylaten ist eine maximal 2.4fache Zunahme des ADP- und 3.4fache des AMP-Gehalts festzustellen. Dem relativen Anstieg der Argininkonzentration um den Faktor 5.3 entspricht der Abnahme des Argininphosphat-Gehalts auf 10/34.

3. Die Massenwirkungsquotienten (MAR)

Aus den Konzentrationen der Metabolite (Tabelle 23 und 24) läßt sich für diverse Reaktionen der MAR, d.h. das Verhältnis von Produkt- zu Substratkonzentrationen, errechnen. In den Tabellen 25 und 26 sind die MAR-Werte aus den Mittelwerten der Metabolitkonzentrationen für die Kontrollgruppen aufgeführt, sowie das sog. "Disäquilibrium", das Verhältnis des MAR-Werts zur apparenten Gleichgewichtskonstanten K_{eq} der entsprechenden Reaktion (Kacser und Burns

Tabelle 25: Der Massenwirkungsquotient (MAR) für die Reaktionen verschiedener Enzyme, errechnet aus den Konzentrationsangaben für den gesamten Weichkörper (Tabelle 23). Angegeben ist das Disäquilibrium (MAR/K_{eq}), sowie für anaerobe Bedingungen die Veränderung des MAR gegenüber den Kontrolltieren.

Reaktion	K_{eq}*	MAR 18°C	(MAR/K_{eq})	MAR 22°C	(MAR/K_{eq})	Veränderung des MAR bei Anoxie	Sprüngen
Phosphorylase	0.28	-		-		-	-
Hexokinase	386	0.21	(0.0005)	0.18	(0.0005)	5.7	4.9
PGlM	17.2	13.9	(0.81)	7.3	(0.41)	1.2	1.3
PGlI	0.3	0.11	(0.38)	0.21	(0.70)	0.7	0.5
PFK	322	0.28	(0.0008)	0.48	(0.0015)	0.46	1.46
		± 0.02		± 0.13		± 0.08	± 0.46
Aldolase	63 uM	1.3 µM	(0.016)	0.6 µM	(0.008)	3.2	3.6
TPI	0.065	0.69	(10.7)	0.52	(7.90)	0.7	0.9
GAPDHxPGK	160/M	-		-		-	-
PGM	0.2	0.62	(3.10)	0.52	(2.58)	3.0	1.2
Enolase	6.3	0.59	(0.09)	0.61	(0.10)	1.9	0.9
PK	6452	52.27	(0.008)	71.33	(0.011)	0.083+	0.36+
		± 17.03		± 11.37		± 0.004	± 0.13
GOT	0.165	0.36	(2.20)	-		-	-
GPT	0.45	0.11	(0.26)	-		-	-
AK	1.97	3.10	(1.57)	3.55	(1.80)	2.8	1.2
MK	0.44	1.07	(2.44)	1.03	(2.30)	1.3	0.6

* Die apparenten K_{eq}-Werte bei pH 7.0 wurden aus den Angaben von Lehninger (1975) für das Verhältnis von Produkt- zu Substratkonzentrationen errechnet.
\+ signifikanter Unterschied zum Wert der Kontrollgruppe (22°C): $p<0.05$
\- Wert konnte auf Grund fehlender Konzentrationsangaben nicht berechnet werden

Tabelle 26: Die Massenwirkungsquotienten (MAR), die aus den Konzentrationsangaben für den Fußmuskel in Tabelle 24 errechnet wurden, im Vergleich mit den entsprechenden K_{eq}-Werten, sowie die Veränderung des MAR gegenüber den Kontrollwerten bei biotopbedingter und funktioneller Anaerobiose.

Reaktion	MAR	Disequilibrium (MAR/K_{eq}*)	Veränderung des MAR bei 2 Std. der Anaerobiose	10 Std. der Anaerobiose	15 Sprüngen	29 Sprüngen	41 Sprüngen
Phosphorylase	0.0024	(0.0084)	1.2	1.9	-	-	-
HK	0.046	(0.0001)	1.1	2.7	6.5	9.5	17.6
PG1M	8.74	(0.51)	1.8	2.8	1.7	1.5	0.7
PG1I	0.122	(0.41)	0.9	0.9	1.0	1.0	0.9
PFK	0.20	(0.00063)	0.9	0.7	3.4+	3.7+	12.5+
	± 0.08		± 0.2	± 0.4	± 1.5	± 1.3	± 3.4
Aldolase	0.73 µM	(0.009)	1.3	0.4	1.2	0.2	-
TPI	0.37	(5.74)	1.2	1.1	2.3	-	-
GAPDHxPGK	0.554/M	(0.0035)	3.0	3.2	-	-	-
PGM	0.31	(1.5)	0.6	0.7	-	-	-
Enolase	1.12	(0.18)	0.7	0.9	0.4	0.6	0.4
PK	43.6	(0.0068)	0.68	0.60	0.65	0.73	0.42+
	± 14.3		± 0.27	± 0.22	± 0.29	± 0.29	± 0.14
GOT	0.182	(1.10)	0.9	0.33	-	-	-
GPT	0.35	(0.79)	1.7	1.0	-	-	-
AK	1.85	(0.94)	1.8	2.6	2.1	3.6	6.8
MK	1.45	(3.30)	1.1	0.8	0.5	0.4	0.5

*,+,- siehe Tabelle 25

1973). Ist der Wert für das "Disäquilibrium" (MAR/K_{eq}) größer als 0.2, so wird angenommen, daß die entsprechende Reaktion nahezu unter Geichgewichtsbedingungen abläuft, ist der Wert dagegen kleiner als 0.05, so wird die Reaktion als "Nicht-Gleichgewichtsreaktion" angesehen (Rolleston 1972). Für die Bedingungen der biotopbedingten und funktionellen Anaerobiose sind nur die Veränderungen des MAR gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe angegeben. Da die MAR-Werte für Reaktionen in biologischen Systemen kleiner als eins sind (Lehninger 1975), bedeutet ein Veränderungsfaktor größer als eins eine Annäherung des MAR an die Gleichgewichtslage. Faktoren kleiner als eins zeigen dagegen eine Vergrößerung der Diskrepanz zwischen MAR und K_{eq} an. Nur für die Reaktionen der PFK und der PK sind aus den Meßwerten der einzelnen Tiere ein Mittelwert mit Standardabweichung für die Veränderungen errechnet worden, um die Signifikanz von Änderungen nachweisen zu können.

a) Gesamter Weichkörper

aa) biotopbedingte Anaerobiose

Unter den Bedingungen der biotopbedingten Anaerobiose nähern sich die MAR-Werte von HK, Aldolase und GAPDH deutlich dem K_{eq} (Verschiebung des MAR größer als eins), wohingegen der Wert der PK-Reaktion sich signifikant weiter als in den Kontrolltieren davon entfernt. Das bedeutet, daß die Umsetzung von F-6-P zu FBP gehemmt wird. Die Veränderung des MAR-Wertes der PFK-Reaktion ist nicht signifikant.

bb) funktionelle Anaerobiose

Die oben angeführten Verschiebungen der MAR-Werte treten bei Muskeltätigkeit ebenfalls ein, wobei auch unter diesen Bedingungen die PK-Reaktion verstärkt als limitierender Schritt der Glykolyse wirkt ($p < 0.01$). Die Annäherung des MAR der PFK-Reaktion an den K_{eq}-Wert ist nicht signifikant. (Tabelle 25).

cc) Die MAR-Werte und das "Disäquilibrium"

Vergleicht man die MAR-Werte für Kontrolltiere vom Mai mit denen vom September (Tabelle 25), so differiert kein entsprechender MAR-Wert um mehr als den Faktor 2, was bei den gegebenen individuellen Schwankungen als sehr gute

Übereinstimmung anzusehen ist.
Während die meisten Reaktionen der Glykolyse und ebenso die Reaktionen von GOT, GPT, AK und der MK nahezu unter Gleichgewichtsbedingungen ablaufen, sind die Reaktionen von PFK und PK, sowie auch der Hexokinase und Aldolase mit einem "Disäquilibrium" von 0.05 und kleiner als "Nicht-Gleichgewichtsreaktionen" ausgewiesen (Tabelle 24). Der "Nicht-Gleichgewichtszustand" der Hexokinase-Reaktion ist aber eher eine Folge der sehr geringen Hexokinaseaktivität in den Muskelgeweben, so daß keine Umsetzung von Glucose zu G-6-P stattfinden kann, (Tabelle 22) und weniger Ausdruck einer Regulation.

b) Fußmuskel

Im Fußmuskel sind die Reaktionen von Phosphorylase, (Hexokinase, s.o.), PFK, Aldolase, GAPDHxPGK und PK als die "Nicht-Gleichgewichtsreaktionen" mit Abweichungen des MAR vom K_{eq} größer als der Faktor 1000 zu erkennen (Tabelle 26). Zur Berechnung des MAR-Wertes der kombinierten Reaktion der Enzyme GAPDH und PGK wurde das $NADH+H^+/NAD^+$-Verhältnis aus der Gleichgewichtsreaktion der LDH mit dem apparenten $K_{eq} = 7.35x10^4$ und den gemessenen Pyruvat- und D-Lactatkonzentrationen errechnet.

aa) biotopbedingte Anaerobiose

Nach anaerober Inkubation sind keine signifikanten Änderungen der Gleichgewichtsbedingungen von PFK und PK festzustellen (Tabelle 26).

bb) funktionelle Anaerobiose

Bei Muskeltätigkeit ist eine Aktivierung der PFK anhand eines signifikant ($p < 0.05$) vergrößerten und damit an den K_{eq} angenäherten MAR zu beobachten (Tabelle 26). Bei zunehmender Muskeltätigkeit erweist sich die PK-Reaktion wieder als limitierender Schritt der Glykolyse, denn der MAR weicht bei 41 Sprüngen von dem Wert der Kontrolltieren signifikant nach unten ab.

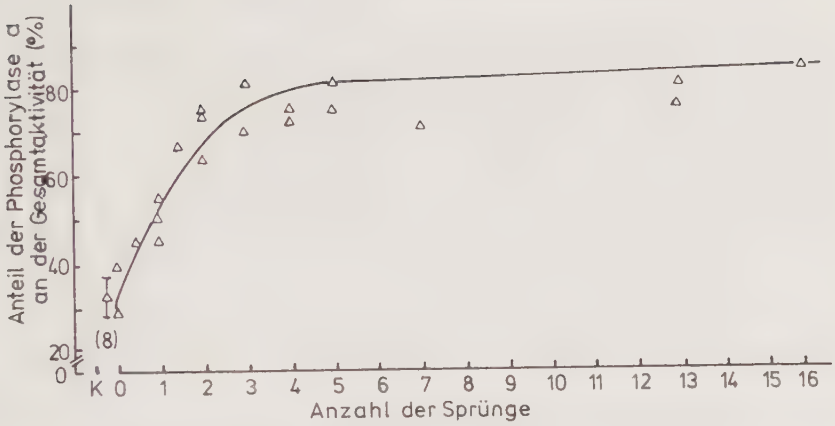

Abb. 21: Der Anteil der AMP-unabhängigen Phosphorylase **a** an der gesamten Phosphorylase-Aktivität in Abhängigkeit von der Anzahl der ausgeführten Fluchtbewegungen.

4. Aktivierung der Glykogenphosphorylase

In Ruhetieren lag die Phosphorylase zu 31.8% ± 4.2% (n = 6) in der Form a vor. Nach zwei Stunden der anaeroben Inkubation hatte die Form a einen Anteil von 55.8% ± 5.1% (n = 4) an der gesamten Phosphorylase-Aktivität. Dieser Anteil reduzierte sich nach 6 Std. der Anaerobiose auf 45.9% ± 3.9% (n = 3). Lag der Wert zunächst bei etwa 30%, so erhöhte sich der Anteil der AMP-unabhängigen Phosphorylase a bei Muskeltätigkeit nach 2 bis 3 Sprüngen, d.h. innerhalb von nur 5 bis 6 Sekunden, auf den maximalen Wert von 80% bis 85% (Abb. 21).
Die Messung der Phosphatabhängigkeit der Glykogenphosphorylase-Aktivität im Rohextrakt ergab einen K_M-Wert von 8.2 mM Phosphat.

5. Die Regulation der PFK-Aktivität

Die Aktivität der PFK wurde in Muskelgeweben mit ca. 4 bis 5 U/g FG und in Kiemen und Hepatopancreas mit jeweils ca. 1 U/g FG bestimmt (s. Tabelle 22). In den entsalzten Rohextrakten von Muskel-, Kiemen- und Hepatopancreasgewebe waren nur geringe gewebsspezifische Unterschiede in der Affinität der PFK zu F-6-P (K_M ca. 0.75 mM) und in der aktivierenden Wirkung von ADP und AMP festzustellen (Tabelle 27A), die nicht näher untersucht wurden. Bei einer ATP-Konzentration von 4 mM bewirken 0.29 mM AMP bzw. 0.36 mM ADP mindestens eine Vervierfachung der Affinität der PFK zum F-6-P. An der schwach ausgeprägten Kooperativität der Enzymuntereinheiten ändert sich dabei nichts (Hill-Koeffizient h = 0.9 - 1.4). Phosphat hat nur in hohen Konzentrationen (16 mM) einen affinitätssteigernden Effekt (Tabelle 27B).
Bei Vorgabe einer Gesamtkonzentration von 5.5 µMol ATP + ADP + AMP pro ml Testansatz wurden die Verhältnisse der Adenylate ("energy charge") im Fußgewebe für verschiedene physiologische Situationen simuliert.
Wird der "energy charge" auf 0.946 eingestellt, wie er für die Fußgewebe aerober Ruhetiere typisch ist (Tabelle 24), so wird ein K_M-Wert der PFK für F-6-P von 0.5 mM gemessen (Tabelle 27C). Wird ein Wert für den "energy charge" vorgegeben, wie er nach intensiver (0.912) und erschöpfender Muskeltätigkeit (0.827) auftritt, so sinkt der K_M-Wert für F-6-P auf 0.3 mM bzw. sogar 0.08 mM (Tabelle 27C).
Metabolite, die bekanntermaßen die Aktivität der PFK anderer Tierarten modulieren, wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die PFK in Rohextrakten von

Tabelle 27: Die Aktivität (U/g FG), die Affinität zum Substrat F-6-P (K_M) und der sog. Hill-Koeffizient (h) der Phosphofructokinase (PFK), gemessen in entsalzten Rohextrakten.

A. PFK-Aktivität in verschiedenen Geweben bei 1 mM ATP, 5 mM Mg^{2+}

Gewebe:	Fuß		Schließmuskel		Kiemen		Hepatopancreas	
Bedingungen:	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit
			0.3 mM AMP und 2 mM Phosphat					
V_{max} (U/g FG)	4.7	5.0	3.3	4.6	1.1	1.0	0.9	0.8
K_M (mM F-6-P)	0.81	0.16	0.78	0.15	0.72	0.20	0.74	0.19
h	1.0	1.5	0.9	1.4	1.1	1.2	1.2	0.9

B. Die Wirkung von AMP, ADP und Phosphat auf die Aktivität der PFK aus Fußgewebe*

Bedingungen:	4 mM ATP, 5 mM Mg^{2+} plus			
	0.04 mM AMP	0.29 mM AMP	0.36 mM ADP	1.3 mM ADP
V_{max} (U/g FG)	6.2 - 7.2	5.4 - 5.7	6.9 - 8.4	6.2 - 8.2
K_M (mM F-6-P)	0.28 - 0.53	0.11 - 0.19	0.10 - 0.15	0.09 - 0.10
h	1.4 - 1.4	0.9 - 1.5	1.0 - 1.2	1.2 - 1.5

	0.8 mM P_i	4 mM P_i	16 mM P_i
V_{max} (U/g FG)	6.1 - 7.3	5.2 - 7.4	6.5 - 7.5
K_M (mM F-6-P)	0.75 - 1.76	0.67 - 1.27	0.45 - 0.59
h	0.9 - 1.2	0.9 - 1.1	1.1 - 1.1

C. Der Effekt verschieden kombinierter Adenylatkonzentrationen auf die Aktivität der PFK aus Fußgewebe

"energy charge"	0.946´	0.912"	0.827"´
Summe der Adenylate	5.55 mM	5.5 mM	5.5 mM
V_{max} (U/g FG)	5.2 - 5.8	5.0 - 6.2	4.7 - 5.1
K_M (mM F-6-P)	0.42 - 0.67	0.27 - 0.39	0.08 - 0.09
h	1.0 - 1.2	1.1 - 1.3	1.1 - 1.2

´ 5 mM ATP, 0.5 mM ADP, 0.05 mM AMP und 6 mM Mg^{2+}
" 4.6 mM ATP, 0.75 mM ADP, 0.15 mM AMP und 6 mM Mg^{2+}
"´ 3.9 mM ATP, 1.3 mM ADP, 0.3 mM AMP und 6 mM Mg^{2+}
* Es sind die Messungen in zwei verschiedenen Extrakten aufgeführt

Tabelle 28: Die Aktivität (U/g FG), die Affinität zum Substrat PEP (K_M) und der Hill-Koeffizient (h) der Pyruvatkinase (PK), gemessen in mindestens zwei verschiedenen entsalzten Rohextrakten bei 2 mM ADP und 3 mM Mg^{2+}. V_{max} wurde bei 1.0 mM PEP und 0.1 mM FBP bestimmt.

A. Aktivitäten der PK in verschiedenen Geweben#

Gewebe	Fußmuskel	Kiemen	Hepatopancreas
V_{max} (U/g FG)	19.2 - 39.8	13.0 - 16.0	0.73 - 0.94
K_M (mM PEP)	0.12 - 0.13	0.31 - 0.36	0.33 - 0.45
h	1.6 - 1.7	2.0 - 2.2	2.0 - 2.2

B. Die Eigenschaften der PK in Extrakten anaerob inkubierter Muscheln

Bedingungen	2 Std. Anoxie		6 Std. Anoxie	
Gewebe	Fuß	Kiemen	Fuß	Kiemen
V_{max} (U/g FG)	21.4 - 39.8	13.3 - 15.9	26.5 - 39.1	13.1 - 15.0
K_M (mM PEP)	0.13 - 0.14	0.43 - 0.45	0.12 - 0.15	0.42 - 0.46
h	1.5 - 1.5	2.3 - 2.5	1.3 - 1.5	1.7 - 1.8

C. Die hemmende Wirkung von L-Alanin auf die PK in Fußmuskelextrakten

Bedingungen	aerob		2 Std. Anoxie	6 Std. Anoxie
Alanin-Konz.	10 mM	100 mM	10 mM	10 mM
V_{max} (U/g FG)	22.0 - 33.8	16.1 - 31.6	23.7 - 24.1	28.8 - 29.9
$V_{1\ mM\ PEP}$*	84.6% - 92.3%	85.1% - 87.2%	60.7% - 71.0%	45.5% - 65.5%
K_M (mM PEP)	0.41 - 0.49	0.52 - 0.53	0.45 - 0.78	0.71 - 1.12
h	2.4 - 2.6	2.5 - 2.9	1.8 - 2.0	1.6 - 2.5

* Aktivität bei 1 mM PEP, ohne Zugabe von 0.1 mM FBP als % V_{max}

D. Aufhebung der Alanin-Hemmung bei der PK-Form der Kiemen durch FBP

Bedingungen	aerob	2 Std. Anoxie	6 Std. Anoxie
V_{max} (U/g FG)	12.9 - 18.3	10.4 - 11.3	8.2 - 11.2
Restaktivität*	5.3 - 8.6%	6.8 - 7.3%	0.5 - 3.4%
K_A (uM FBP)	1.6 - 1.7	8.9 - 10.1	18.3 - 23.0
h	0.8 - 1.1	0.8 - 1.0	0.9 - 1.0

* bei 10 mM Alanin und 1.5 mM PEP

\# Es sind die Messungen in zwei verschiedenen Extrakten aufgeführt

Tabelle 29: Die Wirkung simulierter physiologischer Bedingungen bei aeroben und anaeroben Verhältnissen auf die Aktivität der entsprechenden PK-Form. Die maximale Aktivität wurde für 1 mM PEP bei 0.1 mM FBP ermittelt.

A. aerobe Bedingungen

Pyruvatkinase	aus "aerobem" Fußmuskel		aus "aeroben" Kiemen
"energy charge"	0.944´	0.944´	0.790"
Alanin	1.5 mM	1.5 mM	1.5 mM
D-Lactat	-	-	-
FBP	-	0.10 mM	0.10 mM
V_{max} (U/g FG)	17.2 - 22.8	35.1	7.3 - 8.7
$V_{1\ mM\ PEP}$*	67.8 - 69.9	100	100
K_M (mM PEP)	0.51 - 0.55	0.09	0.07 - 0.09
h	1.4 - 1.5	1.1	1.5 - 2.0

B. anaerobe Bedingungen

Pyruvatkinase	aus "anaerobem" Fußmuskel		aus "anaeroben" Kiemen
"energy charge"	0.894"´	0.894"´	0.790"
Alanin	8.0 mM	8.0 mM	8.0 mM
D-Lactat	5.0 mM	5.0 mM	5.0 mM
FBP	-	0.01 mM	0.10 mM
V_{max} (U/g FG)	12.9 - 17.6	12.8 - 18.3	7.1 - 9.4
$V_{1\ mM\ PEP}$*	50.1% - 54.4%	71.4% - 81.7%	100
K_M (mM PEP)	0.93 - 1.08	0.32 - 0.33	0.29 - 0.43
h	1.2 - 1.3	0.8 - 1.4	1.0 - 1.1

* Aktivität bei 1 mM PEP, ohne Zugabe von 0.1 mM FBP als % V_{max}
´ 4 mM ATP, 0.45 mM ADP, 0.05 mM AMP und 5 mM Mg^{2+}
" 1 mM ATP, 0.45 mM ADP, 0.10 mM AMP und 2 mM Mg^{2+}
"´ 3.7 mM ATP, 0.65 mM ADP, 0.15 mM AMP und 5 mM Mg^{2+}

C. tuberculatum untersucht, aber weder PEP noch Citrat, Succinat, Octopin, D-Lactat oder Alanin hatten in physiologischen Konzentrationen keinen Effekt auf die Aktivität der PFK. Die Wirkung von Fruktose-2,6-phosphat wurde noch nicht untersucht.

Nach einer anaeroben Inkubation von zwei bzw. sechs Stunden konnten in Rohextrakten von Fußgeweben keine deutlichen Veränderungen in der Affinität der PFK zum F-6-P, der Kooperativität der Untereinheiten und dem Verhalten bei Zugabe von AMP oder ADP nachgewiesen werden.

6. Die Formen der PK und ihre Regulation

a) Gewebsspezifische Formen

Die Messungen der PK-Aktivitäten unter optimalen Bedingungen ergaben im Fußgewebe ca. 40 U/g FG, in Kiemen ca. 12 U/g FG und im Hepatopancreas weniger als 1 U/g FG (s. Tabelle 28A).
Die katalytischen Eigenschaften der PK in den Rohextrakten von Kiemen und Hepatopancreas sind sich sehr ähnlich, unterscheiden sich aber von denen der PK in Muskelextrakten (Tabelle 28A). Die PK des Muskels weist eine sigmoide Sättigungskurve für das Substrat PEP auf (Hill-Koeffizient h = 1.6 - 1.7) und die Konzentration halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit (K_M-Wert) liegt bei 0.12 mM PEP. Bei dem Enzym der Nichtmuskelgewebe (durch die PK der Kiemen repräsentiert) ist die Sigmoidität der Sättigungskurve ausgeprägter (h = 2.0 - 2.2) und der entsprechende K_M-Wert liegt bei ca. 0.35 mM PEP.

b) Die Regulation der Aktivität

Die PK-Formen von Fuß- und Kiemenextrakt differieren auch hinsichtlich der Wirkung des Aktivators FBP und des hemmenden Metaboliten L-Alanin. FBP (0.1 mM) bewirkt eine geringfügige Erhöhung der Affinität der Muskel-PK für PEP (K_M = 0.09 mM), hat aber eine starke Wirkung auf die Affinität der Kiemen-PK zum PEP, denn der K_M-Wert für PEP beträgt in Gegenwart von FBP 0.08 mM (s. Tabelle 29A).
Durch 10 mM oder 100 mM Alanin im Testansatz reduziert sich die Affinität der PK-Form des Muskels zum PEP auf 1/4 bzw. 1/5 der ungehemmten PK (Tabelle 28C). Durch hohe PEP-Konzentrationen (1.0 mM) wird aber fast die maximale Unsatzrate

(mehr als 85%) wiederhergestellt. Bei 10 mM Alanin weist die PK der Kiemen bei 1.5 mM PEP nur noch eine Restaktivität von ca. 5% auf, bei 100 mM Alanin ist keine Aktivität mehr festzustellen. Die Hemmung durch Alanin kann bei beiden PK-Formen schon durch sehr geringe FBP-Konzentrationen (0.02 mM) vollständig aufgehoben werden.

Eine hemmende Wirkung von D-Lactat, wie sie an gereinigter PK gezeigt wurde (Chrispeels und Gäde 1985), konnte bei diesen Untersuchungen weder für die PK in Rohextrakten von Fußmuskeln, noch in denen von Kiemen beobachtet werden. Eine Veränderung der regulatorischen Eigenschaften bei der Reinigung des Enzyms wird auch für die PK von Mytilus galloprovincialis berichtet (Sanchez et al. 1985): Diese PK verliert bei der Reinigung einen Teil der Affinität zum Inhibitor Alanin.

c) Veränderungen der PK bei biotopbedingter Anaerobiose

Nach zwei bzw. sechs Stunden anaerober Inkubation weisen die beiden PK-Formen in Rohextrakten von Fuß und Kiemen nahezu die gleichen Affinitäten und Hill-Koeffizienten wie in den entsprechenden Extrakten von aeroben Ruhetieren auf (Tabelle 28B).

Bei der Muskel-PK ist zu beobachten, daß die hemmende Wirkung von Alanin auf die Enzymaktivität ausgeprägter ist. Bei der PK-Form aus 6 Std. anaerob inkubierten Muscheln wird durch 10 mM Alanin im Testansatz die Affinität zu PEP auf 1/5 reduziert (K_M = 0.7 mM) und die Reaktionsgeschwindigkeit bei 1 mM PEP beträgt nur 45% - 65% der maximal möglichen Umsetzungsrate (Tabelle 28C). Ebenso wie die PK aus den Kiemen aerober Tiere, wird die PK aus den Kiemen anaerob inkubierter Muscheln durch 10 mM Alanin fast vollständig gehemmt. Während aber die Hemmung der PK aus den Kiemen aerober Tiere durch Alanin schon durch geringste Mengen an FBP (Aktivierungskonstante K_A = 1.6 µM FBP) aufgehoben werden kann, ist mit zunehmender Anaerobiosedauer eine Abnahme der Affinität der jeweiligen PK-Form zum Aktivator FBP festzustellen (Tabelle 28D): Der Wert der Aktivierungskonstanten ist nach 2 Std. der Anaerobiose ca. 10 µM FBP und nach 6 Std. ca. 20 µM FBP, d.h. zur Aufhebung der Alanin-Hemmung sind mit zunehmender Anaerobiosedauer höhere Konzentration des FBP notwendig.

d) Simulierung der physiologischen Bedingungen bei Anaerobiose

Entsprechend der PFK-Versuchsreihe wurde durch Vorgabe bestimmter Adenylat-,

D-Lactat-, Alanin- und FBP-Konzentrationen der Versuch gemacht, die metabolische Situation für die Aktivität der jeweiligen PK-Form in Fuß und Kiemen in aeroben Ruhetieren und anaerob inkubierten Muscheln herzustellen. Die gewählten Konzentrationen orientierten sich für die Fußgewebe an den Werten in Tabelle 24 und für das Kiemengewebe bezüglich der Adenylate an den Werten für die Kiemen von C. edule (Meinardus und Gäde 1981).
Durch die höhere ATP-Konzentration wird offensichtlich gegenüber den Standardtestbedingungen sowohl die maximale Reaktionsgeschwindigkeit um 30% reduziert, als auch die Affinität zum PEP um 1/3 verringert. Obwohl der "energy charge" für die "anaerobe" Muskelform der PK von 0.944 auf 0.874 gesenkt wurde, d.h. die ATP-Konzentrationen erniedrigt und die von ADP und AMP erhöht wurden, änderte sich am Ausmaß der ATP-Hemmung wenig, wie die Aufhebung der zusätzlichen Hemmung durch 8 mM Alanin mit 0.01 mM FBP zeigt (Tabelle 29B). An dieser PK-Form verursachte Alanin bei einem "energy charge"-Wert von 0.894 eine Erhöhung des K_M-Wertes für PEP auf ca. 1 mM und eine Reduzierung der maximal möglichen Reaktionsgeschwindigkeit um 50%.
Die Affinität der PK-Form in den Kiemen aerober Muscheln entspricht unter simulierten aeroben Bedingungen der unter den Standardbedingungen des Aktivitätstests, aber die Reaktionsgeschwindigkeit ist um 30% reduziert (Tabelle 29). Bei gleichen Adenylatkonzentrationen mit 8 mM Alanin, aber auch mit 0.1 mM FBP im Testansatz, die die Alanin-Hemmung wieder aufheben sollten, ist die PEP-Affinität der PK aus den Kiemen anaerob inkubierter Tiere auf 1/4 bis 1/5 der aeroben Form reduziert (K_M = 0.3 - 0.4 mM).

IV. Diskussion

1. Die Kapazität der verschiedenen Energiestoffwechselwege

Parallel zu den Bestimmungen der Metabolite in C. tuberculatum wurde anhand von Messungen der Aktivitäten der beteiligten Enzyme unter optimalen Bedingungen eine Abschätzung der Kapazitäten des aeroben und anaeroben Energiestoffwechsels vorgenommen (Tabelle 22). So sind bei C. tuberculatum die Aktivitäten der Enzyme des Krebs-Zyklus (CS, ICDH, MDH, Tabelle 1) und damit die Kapazitäten des aeroben Stoffwechsels verglichen mit anderen Mollusken besonders in den Muskelgeweben gering. Im Mantelmuskel des strikt aeroben Kalamars Loligo opalenscens z.B.wurden 8 U CS, 2.5 U ICDH und 126 U MDH/g FG gemessen

(Ballantyne et al. 1982) und selbst im Schließmuskel der sessilen Auster Ostrea edulis fand man 1.8 U CS und 1 U ICDH/g FG (de Zwaan 1977).
Auch die Konzentrationen der Metabolite des Krebs-Zyklus (Tabellen 23 und 24) spiegeln die geringe aerobe Kapazität der Gewebe von C. tuberculatum wieder, denn im Fußmuskel sind die entsprechenden Konzentrationen etwa zehnmal geringer als z.B. im Mantelmuskel von Loligo pealeii (Storey und Storey 1978).
Im Gegensatz dazu ist die Kapazität des anaeroben Stoffwechsels sehr ausgeprägt. Die Aktivitäten der AK, Glykogen-Phosphorylase und des Aspartat mobilisierenden Enzyms GOT sind sehr hoch und übertreffen beispielsweise, ebenso wie die Aktivitäten der glykolytischen Enzyme, die entsprechenden Aktivitäten im Schließmuskel von Mytilus edulis um das 2- bis 5fache (Ebberink und de Zwaan 1980, de Zwaan und Dando 1984). Die maximalen Aktivitäten der Phosphorylase, und der PFK sind in Fuß und Kiemen niedriger als die aller anderen Enzyme des Embden-Meyerhof-Abbaus. Dies war zu erwarten (Rognstad 1972), da es sich um Enzyme handelt, über deren Aktivität eine Substratkette reguliert werden soll. Die PK zählt dagegen in den Muskelgeweben zu den glykolytischen Enzymen, die mit den höchsten Aktivitäten vertreten sind.
Da die Aktivität der PEPCK sehr gering ist (0.1 U/g FG), erscheint eine Verzweigung des Stoffwechsels auf der Stufe des PEP in C. tuberculatum sehr unwahrscheinlich. Bereits die Untersuchungen der gebildeten Endprodukte und der Art ihrer Anhäufung während der biotopbedingten Anaerobiose hatte zu diesem Schluß geführt (Gäde 1980c). Die Versuche mit spezifischen Stoffwechselinhibitoren bestätigen nun, daß die Succinatbildung aus Glykogen lediglich einen sehr geringen Anteil an der anaeroben Energiegewinnung einnimmt (s. Teil B,III,4a).

2. Der Einfluß verschiedener Enzyme auf die Glykolyserate

Die Bestimmung der Zwischenprodukte der Glykolyse bei unterschiedlichen anaeroben Bedingungen erlaubt anhand der errechneten MAR eine Aussage über den jeweiligen regulierenden Einfluß der verschiedenen Enzyme (Tabellen 25 und 26). Der Vergleich des MAR mit dem K_{eq}-Wert der entsprechenden Reaktion weist die Reaktionen von Phosphorylase, PFK und PK als limitierende Schritte der Glykolyse aus. Die große Diskrepanz zwischen MAR und K_{eq} liegt darin begründet, daß diese Reaktionen unter physiologischen Bedingungen irreversibel sind und in der Gegenrichtung durch andere spezifische Reaktionen umgangen werden müssen. In C. tuberculatum erscheint auch die Aldolase als "Nichtgleichgewichtsenzym",

Tabelle 30: Die Glykolyserate (nMol Glykosyleinheiten/g FG/Min.) in aeroben Ruhetieren, während biotopbedingter Anaerobiose und bei Muskeltätigkeit, berechnet für den gesamten Weichkörper und den Fußmuskel aus dem Sauerstoffverbrauch* sowie aus den Endproduktkonzentrationen in Tabelle 23 und 24.

Bedingungen	Metabolische Veränderungen pro g Frischgewicht	Glykolyserate (nMol/g FG/Min.)	aerob / anaerob
A Ganztier, 22°C			
1 Std. aerob	5.5 ± 1.0 µMol O_2	15.25	1
10 Std. Anoxie	3.33 µMol D-Lactat + 2.23 µMol Alanin + 0.23 µMol Octopin	4.8	0.31
32 Sprünge in 88 Sekunden	1.66 µMol Octopin	565	37.1
B Fußgewebe, 16.5°C			
1 Std. aerob	2.4 ± 0.5 µMol O_2	6.67	1
2 Std. Anoxie	0.45 µMol D-Lactat + 1.47 µMol Alanin + 0.02 µMol Octopin	8.1	1.2
2 bis 10 Std. Anoxie	1.00 µMol D-Lactat + 0.82 µMol Alanin + 0.01 µMol Octopin	1.5	0.22
15 Sprünge in 23 Sekunden	0.79 µMol Octopin	1095	156
29 Sprünge in 59 Sekunden	1.34 µMol Octopin	683	103.5
41 Sprünge in 113 Sekunden	3.10 µMol Octopin	823	123

* siehe Teil D: Es wird angenommen, daß nur Kohlenhydrate (6 µMol O_2/µMol Glykosyleinheit) veratmet werden.

allerdings wird dies nicht so deutlich wie bei PFK und PK (Tabellen 25 und 26). Eine vergleichbare Beobachtung wurde auch in Muskel- und Hepatopancreasgeweben von M. edulis gemacht (Ebberink und de Zwaan 1980, Cameselle et al. 1980). Es wird diskutiert, daß die Aldolase bei den Invertebraten die Integrationstelle von Krebs-Zyklus und Glykolyse darstellt (Storey 1980). Bei den Vertebraten kann die PFK durch Citrat gehemmt werden, was bei Invertebraten nicht der Fall ist (s. Hochachka 1985); dafür wird aber im Insektenmuskel die Aktivität der Aldolase durch Citrat gehemmt (Storey 1980).

Aus den Konzentrationen der Glykolyseendprodukte D-Lactat, Alanin und Octopin läßt sich die Umsatzrate der Glykolyse unter den Bedingungen der biotopbedingten und funktionellen Anaerobiose ableiten, zu denen die jeweiligen Regulationszustände der Schlüsselenzyme gehören (Tabelle 30). Geht man nun von der Annahme aus, daß die Muscheln nur Kohlenhydrate veratmen, dann ist die Glykolyserate im Weichkörper von C. tuberculatum nach 10 Std. biotopbedingter Anaerobiose gegenüber den aeroben Ruhetieren auf 31% reduziert worden. Während eine Hemmung der PFK-Reaktion nicht signifikant ist, wird durch den stark reduzierten MAR-Wert deutlich, daß hier eine Hemmung der Glykolyse verstärkt am Schritt der PK erfolgt. Im Fußgewebe findet man nach mehr als 2 Std. der Anaerobiose ebenfalls eine starke Reduzierung der Glykolyserate auf 16% des aeroben Ruhewertes. Dabei wird angenommen, daß der Sauerstoffverbrauch, der für das ganze Tier gemessen wurde, für den Fußmuskel repräsentativ ist. Die ermittelte Verschiebung der MAR-Werte deutet eine Beteiligung von PFK- und PK-Reaktion an der Regulation an, die aber nicht signifikant nachzuweisen ist (Tabellen 25 und 26).

Bei Muskeltätigkeit erhöht sich die Glykolyserate im gesamten Weichkörper innerhalb von 88 Sekunden etwa um das 30fache, ohne daß eine signifikante Veränderung der Gleichgewichtslage der PFK zu erkennen wäre. Dagegen tritt auch unter diesen Bedingungen der limitierende Charakter der PK-Reaktion deutlich hervor (Tabelle 25). Zur rascheren Umsetzung der gestiegenen Mengen an F-6-P wird also die Affinität der PFK zum F-6-P nur wenig verändert und lediglich die maximale Reaktionsgeschwindigkeit gesteigert. Wenn die PK nicht dem erhöhten Umsatzes der PFK entsprechend aktiviert wird, tritt die PK trotz einer absoluten Umsatzzunahme verstärkt als limitierender Schritt hervor. Zudem kann eine Veränderung des MAR bei Muskeltätigkeit auf bestimmte Gewebe oder Gewebepartien beschränkt sein, was als "lokaler" Vorgang bei der Analyse des gesamten Weichkörpers nicht als signifikant hervortritt.

Im Muskelgewebe des Fußes wird bei funktioneller Anaerobiose eine Erhöhung des

glykolytischen Umsatzes um das 150fache in 23 Sekunden festgestellt (Tabelle 30). In diesem Falle ist eine Aktivierung der PFK anhand der signifikant erhöhten MAR-Werte nachzuweisen. Wie oben für den gesamten Weichkörper beschrieben, tritt auch in diesem Gewebe die PK-Reaktion mit verstärkter Muskeltätigkeit mehr und mehr als limitierender Schritt der Glykolyse hervor (bei 41 Sprüngen, $p < 0.05$).

Der Umstand, daß die drastischen Änderungen des glykolytischen Umsatzes nicht immer mit entsprechenden Veränderungen im MAR bestimmter Reaktionen eingehen und daß die Aldolase als weiteres regulatorisches Enzym zur Diskussion steht, entspricht der Theorie von Kacser und Burns (1973). Man nimmt an, daß die Beeinflussung einer ganzen Substratkette sich auf alle beteiligten Enzyme, wenn auch mit unterschiedlichem Gewicht, verteilt. Die oben genannten Autoren stellten auch heraus, daß sich die regulatorischen Einflüsse der einzelnen Enzyme mit der jeweiligen Umsatzrate verändern. Ein Beispiel dafür ist das verstärkte Hervortreten der Reaktion der PK als limitierender Schritt bei erhöhter Glykolyserate während der Muskeltätigkeit in C. tuberculatum. Die theoretischen Arbeiten von Kacser und Burns (1973) zur Regulation von Substratketten weisen zudem darauf hin, daß die Regulation eines Reaktionsschritts den gesamten Umsatz um so wirkungsvoller beeinflußt, je weiter sie am Anfang der Substratkette steht.

3. Die Aktivierung der Glykogenphosphorylase

In diesem Zusammenhang erscheint es einsichtig, daß sich gerade zur Kontrolle des ersten Schritts der Glykolyse, dem Glykogenabbau durch die Phosphorylase, ein besonders komplexes und effektives Regulationssystem entwickelt hat (s. Teil A,IV,1).
In der Herzmuschel C. tuberculatum arbeitet das Aktivierungssystem der Phosphorylase sehr rasch, wie die maximale Aktivierung des Enzyms innerhalb von 5 bis 6 Sekunden (Abb. 21) zeigt. Dies liefert auch die Erklärung dafür, warum die Beteiligung der Glykolyse an der anaeroben Energieproduktion gleichmäßig und unabhängig von der Anzahl der Fluchtbewegung ist (s. Abb. 6 und 7 in Teil C,III). Trotz der Anwendung aller Maßnahmen, die eine Aktivierung der Phosphorylase während der Extraktbereitung verhindern können ("freeze clamping", Extraktion bei - 10°C) war in den Fußgeweben aerober Ruhetiere eine Aktivierung der Phosphorylase zu ca. 30% festzustellen. Bei einer Gesamtaktivität der

Phosphorylase von ca. 2 U/g FG und unter Berücksichtigung des Umstandes, daß die Konzentration des freien Phosphats (ca. 4 mM) nicht zur Sättigung der Phosphorylase "a" ausreicht (K1M = 8.2 mM), liegt die theoretische Glykogenabbaurate (ca. 0.15 U/g FG) noch eine Zehnerpotenz über der Glykolyserate, die sich aus dem Sauerstoffverbrauch ableiten läßt (ca. 0.015 U/g FG, Tabelle 30). In den Muskeln von M. edulis wurde bei entsprechender Extraktpräparation ein Anteil von 6% - 8% für die Phosphorylase "a" an der gesamten Phosphorylase-Aktivität gemessen, wobei sich dieser Anteil auch bei biotopbedingter Anaerobiose nicht veränderte (Ebberink und Salimans 1982). Bei C. tuberculatum ist eine Aktivierung der Phosphorylase bei anaerober Inkubation erfolgt: Nach zwei Stunden der Anaerobiose sind ca. 56% und nach sechs Stunden ca. 46% der Phosphorylase in der aktiven Form. Die stärkere Aktivierung zu Beginn der Inkubation ist wohl auf die vereinzelten Fluchtbewegungen der Muscheln in dieser Phase zurückzuführen. Die Aktivierung der Phosphorylase bei biotopbedingter Anaerobiose läßt sich auch aus der Erhöhung des Gehalts an G-1-P in den Geweben und dem steigenden MAR ableiten (Tabellen 24 und 26).

4. Die Regulation der Phosphofructokinase

Da die Umsatzrate der Glykolyse unter diesen Bedingungen nicht entsprechend der Aktivierung der Phosphorylase zugenommen hat, müssen an anderen Schritten entsprechend hemmende Mechanismen wirken. Der nächste Schritt der Glykolyse, der eine effektive Regulation ermöglicht, ist die Umsetzung von F-6-P zu FBP durch die PFK. Unter aeroben Bedingungen wird die Aktivität der PFK stark durch ATP und eventuell Argininphosphat gehemmt (Storey 1980, nicht untersucht bei C. tuberculatum). Biotopbedingte Anaerobiose führt nur zu einer moderaten Veränderung des "energy charge" und der Konzentration des Argininphosphats (Tabellen 23 und 24). Dennoch sollten diese Vorgänge eher eine Aktivierung der PFK bewirken als deren Hemmung, wie sich schon durch die Verringerung des MAR unter diesen Bedingungen andeutet (Tabellen 25 und 26). Eine Hemmung der PFK durch PEP, wie sie z.B. bei dem Enzym von M. edulis vorliegt (Ebberink 1982), existiert bei der PFK von C. tuberculatum nicht (Tabelle 30). Zudem sind nur im gesamten Weichkörper, nicht aber im Fuß deutliche Zunahmen des PEP-Gehalts bei biotopbedingter Anaerobiose zu beobachten (Abb. 19). Eine Veränderung der kinetischen Eigenschaften der PFK in Abhängigkeit von anaerober Inkubation wurde ebenfalls nicht beobachtet. Nicht untersucht wurde, ob sich

dabei die Wirkung des sehr effektiven Aktivators Fruktose-2,6-phosphat auf das Enzym verändert. Bei der marinen Schnecke Busycotypus canaliculatum konnte an der PFK nach Anaerobiose festgestellt werden, daß die Affinität des Enzyms zum F-2,6-P abnimmt (Storey 1985a). Außerdem nimmt beispielsweise die Konzentration dieses Metaboliten unter anaeroben Bedingungen besonders in den Nichtmuskelgeweben der Auster und der Miesmuschel ab (Storey 1985b).
Bei Muskeltätigkeit sind im Fuß zum einen eine deutliche Abnahme des "energy charge" und zum anderen eine Zunahme der Konzentration des F-6-P zu beobachten (Tabelle 24). Die Veränderung des "energy charge" reicht aus, um eine 5fache Erhöhung der Affinität der PFK für F-6-P zu bewirken (Tabelle 27), und auf Grund der leicht sigmoiden Substratsättigungskurve (h = 1.4) nimmt bei maximaler Affinität (K1M = 0.085 mM) und 10facher Steigerung der Konzentration von F-6-P auf ca. 0.1 mM der Umsatz um mehr als das 10fache zu. Mit dem Zusammenwirken beider Effekte (Affinitäts- und Konzentrationserhöhung) kann man annähernd die 100fache Zunahme der Glykolyserate bei Muskeltätigkeit erklären. Da die PFK der Herzmuschel nicht durch PEP gehemmt wird, kann eine derartige Aktivierung (ca. 70fach) auch bei Muskeltätigkeit einsetzen, wenn auf Grund einer anaeroben Vorinkubation bereits eine Reduzierung der Glykolyserate eingetreten ist (s. Teil C, Abschnitt IV,3).

5. Die Regulation der Pyruvatkinase

Auch die Regulation des letzten Schrittes der Glykolyse, nämlich die der PK-Reaktion, ist so angelegt, daß selbst unter anaeroben Bedingungen jederzeit eine Anpassung an die Erfordernisse der erhöhten Glykolyserate bei Muskeltätigkeit möglich ist. Die detaillierten Untersuchungen der gereinigten PK aus den Muskelgeweben von C. tuberculatum (Chrispeels und Gäde 1985) haben ergeben, daß dieses Enzym im Gegensatz zur PK von M. edulis (Holwerda et al. 1983) nicht vollständig gehemmt werden kann. Es bleibt auch bei unphysiologisch hohen Alaninkonzentrationen die Aktivität erhalten, allerdings verringert sich dabei die Affinität der PK drastisch (K1M: 0.12 mM PEP ohne Alanin und 0.6 mM bei 100 mM Alanin, Tabelle 28). Dieser Effekt des Alanins auf die Aktivität der PK war bei den Enzymen in Muskelextrakten von anaerob inkubierten Muscheln hinsichtlich der Hemmung der Maximalaktivität und der Verringerung der Affinität doppelt so stark, ohne daß sich die Affinität des ungehemmten Enzyms zum PEP geändert hätte. Die Hemmung der PK durch Alanin läßt sich sowohl bei der aeroben als auch bei der anaeroben Form durch physiologische

Konzentrationen von FBP vollständig aufheben. Die Erhöhung der FBP-Konzentration ist die primäre Wirkung der Aktivierung der PFK bei Muskeltätigkeit, so daß trotz der PK-Hemmung durch Alanin, dem Endprodukt des anaeroben Stoffwechsels bei biotopbedingter Anaerobiose, eine Anpassung des Umsatzes auf der Stufe der PK an den der PFK bei Muskeltätigkeit erfolgen kann. Voraussetzung für diese Anpassung ist, daß bei C. tuberculatum die Affinität der anaeroben Form der PK zum PEP generell nicht verändert worden ist, wie es aber z.B. bei der anaeroben Form der PK von M. edulis (Holwerda et al. 1983) und der PK von B. canaliculatum (Plaxton und Stroey 1984) der Fall ist, denn eine solche Modifikation läßt sich im Bedarfsfall (Muskeltätigkeit) nicht rückgängigmachen.

In den Nichtmuskelgeweben (z.B. Kiemen) von C. tuberculatum findet sich eine Form der PK, die durch ihre geringere Affinität zum PEP und die stärkere Hemmbarkeit durch Alanin mehr an die Reduzierung der Glykolyse bei biotopbedingter Anaerobiose angepaßt ist als die Form der Muskelgewebe. Diese PK aus den Nichtmuskelgeweben ähnelt damit der PK von M. edulis. Nach anaerober Inkubation ist aber sowohl bei der PK aus den Kiemen, als auch beim Muskelenzym die Affinität zum PEP nicht verändert (Tabelle 28). Mit zunehmender Inkubationsdauer wird jedoch die Affinität der PK zum Aktivator FBP sehr viel geringer, gemessen an der Fähigkeit des FBP, die fast vollständige Hemmung durch 10 mM Alanin aufzuheben. Dies führt dazu, daß bei biotopbedingter Anaerobiose trotz relativ wenig gestiegenen Alaninkonzentrationen und einer Zunahme des FBP-Gehalts die Affinität der PK aus den Nichtmuskelgeweben zum PEP 5mal geringer ist als die der aeroben Form unter simulierten aeroben Bedingungen. Dieses Ergebnis bietet eine Erklärung dafür, warum bei der Analyse des gesamten Weichkörpers im Gegensatz zum Fußmuskel eine verstärkt hemmende Funktion der PK bei biotopbedingter Anaerobiose signifikant nachzuweisen ist.

Es wurden die Faktoren untersucht und analysiert, die eine Reduzierung der Glykolyse unter den Bedingungen der biotopbedingten Anaerobiose und deren Aktivierung bei Muskeltätigkeit zu erklären vermögen. Es bleibt dabei aber die Frage offen, wie die Reduzierung der ca. 100fach gesteigerten Glykolyserate bei Beendigung der Muskeltätigkeit erfolgt, so daß keine Bildung anaerober Endprodukte über die Dauer der Muskeltätigkeit hinaus festzustellen ist (s. Teil D,III,7). Eine sofort einsetzende Veratmung der eventuell gebildeten Glykolyseprodukte während der Erholungsphase und eine allmähliche Reduzierung der Glykolyse scheidet auf Grund des gemessenen Sauerstoffverbrauchs in dieser Zeit aus.

G. Der Dualismus von D-Lactat- und Octopinbildung bei C. tuberculatum während biotopbedingter und funktioneller Anaerobiose

Die vorliegenden Untersuchungen stellen einen Beitrag zur Klärung des Dualismus der Pyruvatreduktasen LDH und ODH in ihrer Funktion als terminale Dehydrogenasen der anaeroben Glykolyse bei biotopbedingter bzw. funktioneller Anaerobiose in C. tuberculatum dar (Gäde 1980c). Mit dem Nachweis der Aktivitäten zweier zusätzlicher Pyruvatreduktasen, AlDH und StDH, in dieser Muschelart, erweiterte sich die Fragestellung dahingehend, ob auch diese Dehydrogenasen unter bestimmten physiologischen Bedingungen eine Funktion im anaeroben Energiestoffwechsel haben.
Die Herzmuschel C. tuberculatum kommt in ca. 10 m tiefem Wasser auf sandigen Untergründen des Mittelmeeres vor, einem Biotop also, das fast ständig aerobe Bedingungen bietet. Deshalb scheint die Kapazität des Stoffwechsels nur auf den aeroben Ruhestoffwechsel ausgerichtet zu sein, worauf die niedrigen Aktivitäten der Enzyme und die niedrigen Konzentrationen der Metabolite des Krebs-Zyklus hindeuten (Tabellen 23 und 24). Dem entsprechend kann die Sauerstoffaufnahme nur in relativ geringem Ausmaß (3.5fach) gesteigert werden, so daß ein stark erhöhter Energiebedarf bei intensiver Muskeltätigkeit durch anaerobe Stoffwechselprozesse gedeckt werden muß.
Die Fähigkeit, Serien von springenden Fluchtbewegungen durch kräftiges Abstoßen mit dem Fuß auszuführen, ist eine Besonderheit von C. tuberculatum und bestimmter nahe verwandter Arten.

I. Die Charakteristika des Stoffwechsels bei biotopbedingter Anaerobiose

1. Der anaerobe Kohlenhydratstoffwechsel

Der anaerobe Energiestoffwechsel von C. tuberculatum ist an eine rasche und stark erhöhte Energiebereitstellung angepaßt. Dies machen die großen Argininphosphatreserven und die hohen Aktivitäten der Phosphorylase, der glykolytischen Enzyme, der AK und der ODH in den Muskelgeweben deutlich. Die "Ausstattung" dieser Gewebe entspricht der des Schließmuskels der schwimmender Pecten-Arten und nicht etwa dem sessiler Muscheln wie Miesmuschel oder Auster (de Zwaan et al. 1980, Ebberink und de Zwaan 1980).
Trotz der ausgeprägten Kapazitäten des anaeroben Energiestoffwechsels besitzt C. tuberculatum nur eine begrenzte Toleranz (20 Std. bei 22°C) gegenüber

anoxischen Bedingungen, gemessen an der Fähigkeit vieler sessiler Muscheln, mehrere Tage biotopbedingter Anaerobiose zu überleben. Ein Unterschied des anaeroben Stoffwechsel der springenden Herzmuschel zu dem anaerobiosetoleranter Muscheln ist das Fehlen der Bildung von Propionat und Acetat, sowie die geringe Succinatproduktion bei anaerober Inkubation (Tabelle 1). Die Bildung von Succinat ist bei C. tuberculatum mit dem Abbau von Aspartat und nicht von Glykogen verbunden, wie es die sehr geringe Aktivität der PEPCK andeutet und was dadurch belegt wird, daß die Hemmung des Aspartatabbaus die Succinatbildung stärker beeinflußt als die Verhinderung des Glykolyseablaufs (Tabelle 4). Ein anderes Merkmal des anaeroben Stoffwechsels der Herzmuschel bei biotopbedingter Anaerobiose ist die Bildung von D-Lactat als mengenmäßig bedeutendstes Endprodukt der Glykolyse neben der Anhäufung von Alanin, einem weiteren Derivat des Pyruvats. Die Bildung des Alanins erfolgt in einer Gleichgewichtsreaktion durch Transaminierung entsprechend der Zunahme des Glutamatgehalts, die eine Folge des Aspartatabbaus ist. Dabei schafft die Bildug von einem Mol Succinat aus dem Kohlenstoffgerust des Aspartats den Redoxbilanzausgleich für die Bildung von zwei Mol Alanin. Bei C. tuberculatum werden Alanin und Succinat tatsächlich annähernd im Mengenverhältnis 2:1 während biotopbedingter Anaerobiose angehäuft (Tabelle 1). Die Menge an gebildetem Alanin entspricht zwar nach 15 Std. der Anaerobiose der abgebauten Menge an Aspartat, aber weder der zwischenzeitliche Verbleib der Aminogruppen noch der des Kohlenstoffgerüsts des Aspartats konnten geklärt werden.

2. Die Bildung von D-Lactat

Die Bildung von D-Lactat aus dem Pyruvat der Glykolyse ist ebenfalls eine Gleichgewichtsreaktion. Da die Konzentration des Pyruvats u.a. durch die Alaninbildung relativ konstant gehalten wird (Tabelle 23), spiegelt der Anstieg der D-Lactatkonzentration die Veränderung der Redoxbilanz wider. Fast ausschließlich D-Lactat und nur wenig Octopin und Alanopin treten in C. tuberculatum als Endprodukt der terminalen Dehydrogenasen bei biotopbedingter Anaerobiose auf, obwohl die Aktivität der LDH von allen Pyruvatreduktasen die niedrigste ist (Tabelle 22).
Dieses Phänomen kann mit Hilfe der Gleichgewichtskonstanten der verschiedenen Pyruvatreduktase-Reaktionen aus den physiologischen Konzentrationen der Reaktionspartner (Tabellen 5, 23 und 24) erklärt werden. In Tabelle 31 ist die Berechnung der theoretisch zu erwartenden Mengen der Endprodukte Octopin,

Tabelle 31: Berechnung der theoretischen Mengen an Octopin, Alanopin und Strombin, die unter Gleichgewichtsbedingungen* nach 10 Std. der Anaerobiose bei physiologischen Substratkonzentrationen gebildet werden.

	Fußmuskel´	gesamter Weichkörper"
LDH-Reaktion: app. $K_{eq} = 7.35 \times 10^4 = [D\text{-Lactat}][NAD] / [Pyruvat][NADH]$		
gemessen:	1.62 mM D-Lactat	3.43 mM D-Lactat
daraus folgt $[NAD] / [Pyruvat][NADH] =$	45 488.5/mM	21 459.2/mM
ODH-Reaktion: app. $K_{eq} = 3.33 \times 10^5\ M^{-1} = [Octopin][NAD] / [Pyruvat][Arginin][NADH]$		
gemessen:	11.10 mM Arginin	15.36 mM Arginin
d.h. $3.33 \times 10^5 \times 0.0111$ mM/ 45 488,5 =	0.08 mM Octopin	0.24 mM Octopin
AlDH-Reaktion: app. $K_{eq} = 10^6\ M^{-1} = [Alanopin][NAD] / [Pyruvat][Alanin][NADH]$		
gemessen:	5.06 mM Alanin	4.48 mM Alanin
d.h. $1 \times 10^6 \times 0.00506$ mM/ 45 488.5 =	0.11 mM Alanopin	0.21 mM Alanopin
StDH-Reaktion: app. $K_{eq} = 3.23 \times 10^7\ M^{-1} = [Strombin][NAD] / [Pyruvat][Glycin][NADH]$		
gemessen:	0.74 mM Glycin	0.25 mM Glycin
d.h. $3.23 \times 10^7 \times 0.00074$ mM/ 45 488.5 =	0.53 mM Strombin	= 0.38 mM Strombin

* app. K_{eq}-Werte siehe Teil E,III,9
´ Konzentrationsangaben aus Tabelle 5 und Tabelle 23
" Konzentrationsangaben aus Tabelle 5 und Tabelle 24

Alanopin und Strombin nach 10 Std. biotopbedingter Anaerobiose dargestellt. Vorausgesetzt wird dabei, daß sich alle Reaktionen im idealen Gleichgewichtszustand befinden und daß der gemessene D-Lactatgehalt im Fuß und im gesamten Weichkörper diesen Zustand repräsentiert. Es zeigt sich, daß die theoretischen Octopin- und Alanopinmengen gut mit den gemessenen Werten übereinstimmen. Eine Bildung von Strombin kann in C. tuberculatum nicht erfolgen, weil die Affinität des Enzyms AlDH zum Glycin 250mal geringer ist als die physiologische Konzentration dieser Aminosäure. Zudem wird die Aktivität des Enzyms durch die Endprodukte D-Lactat und Succinat gehemmt. Bei C. tuberculatum ist also das Vorkommen der AlDH/StDH nicht mit hohen Konzentrationen von Alanin oder Glycin korreliert, wie es bei anderen Arten der Fall ist (s.Teil A,VI,2). Es ist nur ein konservatives Protein, das trotz möglicher Veränderungen des Aminosäurespektrums im Laufe der Evolution nicht verloren gegangen ist.
Aus den Berechnungen in Tabelle 31 läßt sich ableiten, daß bei 10- bis 100fach höheren Alanin- bzw. Glycinkonzentrationen, wie sie bei anderen marinen Tieren vorgefunden werden, unter anaeroben Bedingungen die Bildung von Strombin vorrangig vor der des Alanopins und Lactats erfolgen würde. Diese Situation wird bei Pierwurm (Siegmund et al. 1985), Spritzwurm (Pörtner et al. 1984) und Messermuschel (Schiedek 1985) vorgefunden. Die Alanopinbildung im Pierwurm bei funktioneller Anaerobiose (Siegmund et al. 1985) muß analog zur Octopinbildung bei C. tuberculatum wohl mit den kinetischen Eigenschaften der AlDH in Zusammenhang gebracht werden.

3. Die Rolle des Phosphagens

Die Anhäufung der Endprodukte D-Lactat, Alanin und Succinat erfolgt gleichmäßig während der gesamten Dauer der Anaerobiose (Abb. 2), demzufolge ist auch der Energieertrag aus der Glykolyse und der Succinatbildung gleichbleibend. Entsprechendes gilt für den Argininphosphatabbau. Die Phosphagene überbrücken also nicht nur eine Übergangsphase von der aeroben Energiegewinnung bis zur völligen Anpassung des Stoffwechsel an anaerobe Bedingungen, wie es bei M. edulis (Ebberink et al. 1979) oder auch bei C. edule der Fall ist (Meinardus und Gäde 1981). Auch wenn der anaerobe Stoffwechsel von C. tuberculatum nicht in der Lage ist, sich langanhaltenden Perioden mangelnder Sauerstoffversorgung anzupassen, ermöglicht er es dem Tier doch, beschränkte Zeiträume ohne Sauerstoff zu überstehen, wie sie in ihrem Biotop auftreten

können.

II. Die Regulation der Glykolyse

1. Die Glykolyserate bei biotopbedingter Anaerobiose

Die begrenzte Toleranz gegenüber anaeroben Bedingungen ist aber nicht einfach eine Konsequenz der großen Kapazitäten des anaeroben Stoffwechsels in den Muskelgeweben, sondern es tragen spezielle stoffwechselphysiologische Entwicklungen zu dieser Toleranz bei. Unter den Bedingungen biotopbedingter Anaerobiose reduziert die Herzmuschel ihren Energieverbrauch auf 5% des aeroben Wertes und kann auf diese Weise die Argininphosphatvorräte über einen größeren Zeitraum der Anaerobiose strecken. Eine Haushaltung mit den sehr großen Glykogenvorräten erscheint zwar nicht notwendig, doch wird die Glykolyserate unter diesen Bedingungen reduziert. Dabei wurde die aerobe Glykolyserate wahrscheinlich überschätzt, da der Sauerstoffverbrauch nicht vollständig auf der Veratmung von Kohlehydraten beruht. Dennoch erfordert auch die Einhaltung einer konstanten Glykolyserate unter den Bedingungen der biotopbedingten Anaerobiose regulatorische Maßnahmen, denn insbesonders die Veränderungen der Adenylatkonzentrationen führen unter aeroben Bedingungen zu einer Aktivierung der Glykolyse. Ebenso muß einer etwaigen Aktivierung der Phosphorylase bei anaerober Inkubation entgegengewirkt werden.
Eine wichtige Rolle bei der Drosselung der Glykolyserate während der biotopbedingten Anaerobiose kommt der Regulation der PK-Aktivität zu. Die spezifischen Veränderungen der Eigenschaften der PK, die bei anaerober Inkubation wahrscheinlich analog zu den Vorgängen in anderen Muschelarten durch kovalente Modifikation (Phosphorylierung) hervorgerufen werden, verstärken die hemmende Wirkung des anaeroben Glykolyseendprodukts Alanin und setzen die Wirkung des Aktivators FBP herab (Tabelle 28).

2. Der Übergang von biotopbedingter zu funktioneller Anaerobiose

Da die Affinität der anaeroben Form der PK zum PEP nicht verändert ist, kann der Umsatz der PK bei Aufhebung der Hemmung durch Alanin mit hohen Konzentrationen an FBP jederzeit gesteigert werden. Entsprechend hohe FBP-Konzentrationen werden bei funktioneller Anaerobiose in C. tuberculatum vorgefunden (Tabelle 24). Diese Konzentrationen reichen aus, um die 70fache Steigerung der Glykolyserate

zu ermöglichen, wenn die Muskeln in Tätigkeit treten. Auch noch nach einer Reduzierung der Glykolyse durch vorherige anaerobe Inkubation ist dies der Fall (s. Teil C,IV,3). Unter solchen anaeroben Voraussetzungen ist der Beitrag der Glykolyse zur Energiebereitstellung für die Fluchtbewegungen geringer (20%) als bei aerob gehaltenen Muscheln (40%, Tabelle 11B). Dies deutet darauf hin, daß die hemmende Wirkung des Alanins auf die Aktivität der anaeroben PK-Form nicht vollständig durch die entstehenden FBP-Konzentrationen aufgehoben wurde, denn schon unter aeroben Bedingungen ist die Reaktion der PK der limitierende Schritt der Glykolyse (Tabelle 26).

III. Die Bildung von Octopin bei funktioneller Anaerobiose

Ob bei aeroben oder anaeroben Bedingungen, in jedem Fall ist Octopin einziges Endprodukt der Glykolyse bei funktioneller Anaerobiose. Offensichtlich reichen die geringen Aktivitäten der LDH (und GPT) nicht aus, um bei etwa 100fach gesteigerter Pyruvatbildungsrate schnell genug die Umsetzung zu D-Lactat (und Alanin) zu katalysieren. Die Folge ist eine Erhöhung der Konzentration von Pyruvat und NADH. Zusammen mit dem erhöhten Arginingehalt, der die Affinität der ODH zum Pyruvat steigert, sind so die Voraussetzungen gegeben, daß die großen Kapazitäten der ODH die Umsetzung des Pyruvats zum Octopin katalysieren können. Der Vergleich des Ausmaßes von D-Lactat- und Octopinbildung unter Gleichgewichtsbedingungen (Tabelle 31) ergibt, daß die Octopinbildung bei funktioneller Anaerobiose nicht einer Gleichgewichtssituation für alle Pyruvatreduktasen entspricht. Ein weiterer Hinweis darauf, daß die Voraussetzungen der Octopinbildung nicht stabil sind, sondern nur relativ kurzzeitig gegeben sind, ist der Befund, daß bei Muskeltätigkeit gebildetes Octopin sehr rasch in einer nachfolgenden Erholungsphase selbst unter anaeroben Bedingungen wieder abgebaut wird (Abb. 14). Dieser Vorgang wird durch die hohe Affinität der ODH zum Octopin begünstigt (Tabelle 20).
Zusammenfassend kann man feststellen, daß die Grundlage der Bildung von Octopin in den Muskelgeweben von C. tuberculatum die unterschiedlichen Kapazitäten von ODH (ca. 100 U/g FG) und LDH (ca. 4 U/g FG) in Verbindung mit der raschen Steigerung des Glykolyseumsatzes (ca. 100fach in 30 Sekunden) sind. Die Voraussetzungen für eine derartige Steigerung der Glykolyserate sind zum einen durch die maximale Aktivierung der Phosphorylase innerhalb von 4 bis 6 Sekunden gegeben, zum anderen durch die Steigerung des PFK-Umsatzes infolge der Zunahme der F-6-P-Konzentration und durch die gleichzeitige Enthemmung der PFK durch die

Senkung des "energy charge".

IV. Die physiologischen Vorteile der Octopin- bzw. Lactatbildung

Die Frage, warum bei C. tuberculatum ebenso wie bei anderen Mollusken und marinen Vertebraten bei funktioneller Anaerobiose die Octopinbildung an die Stelle der Lactatbildung tritt (s. Gäde 1980a), kann nicht schlüssig beantwortet werden (Fields 1983). Die Koppelung der Glykolyse mit dem Abbau des Phosphagens Argininphosphat, wie sie bei der Kondensationsreaktion der Octopinbildung vorliegt, bietet zwei Vorteile. Einerseits wird freies Arginin dem Gleichgewicht der Argininkinase-Reaktion entzogen, wodurch die Nutzung der Phosphagenreserven verbessert wird. Die Zunahme der Konzentration des Arginins verstärkt anderseits die Umsetzung von Pyruvat und NADH, so daß die (geringfügige) Zunahme der Pyruvat- und NADH-Konzentrationen nicht proportional zur Octopinanhäufung erfolgen muß, wie es der Fall ist, wenn Lactat gebildet wird (Fields 1983). Die Aufrechterhaltung einer möglichst niedrigen Redoxbilanz ist wiederum für den Ablauf der Glykolyse unter anaeroben Bedingungen sehr wichtig (s.o.). Die Gleichgewichtskonstante der octopinbildenden Reaktion ist der Grund dafür, daß Octopin nicht in den gleichen Mengen angehäuft werden kann wie Lactat. Daher kann es auch nicht als bedeutendes Endprodukt während biotopbedingter Anaerobiose auftreten (s. Gäde 1980a). Als eine indirekte Folge der Reaktionsgleichgewichte ist auch die Oxidation des Octopins durch die ODH gegenüber der Lactatoxidation begünstigt (s.Teil E). Daher erfolgt bei Tieren, die im gleichen Gewebe das Pyruvat reduzieren und das entsprechende Produkt während der Erholungsphase auch wieder oxidieren, ein rascherer Abbau von Octopin als von D-Lactat. In C. tuberculatum wird innerhalb von 30 Minuten nach Beendigung der Muskeltätigkeit das gebildete Octopin wieder oxidiert, während der Abbau der nicht sehr viel größeren D-Lactatmengen nach anaerober Inkubation mehr als 12 Stunden dauert (Abb. 13). Ein ähnlicher Verlauf der Lactatoxidation ist auch bei C. edule während der Erholung nach biotopbedingter Anaerobiose zu beobachten, obwohl diese Art deutlich höhere LDH-Aktivitäten aufweist (Meinardus und Gäde 1981).

Ist die Bildung und Oxidation des anaeroben Glykolyseendprodukts auf verschiedene Gewebe verteilt, wie es bei den Vertebraten für Lactat der Fall ist, so bietet das kleinere Lactatmolekül gegenüber dem Octopin zudem den Vorteil, daß es vollständig zu Wasser und CO_2 oxidert werden kann: Im Falle des Octopins müßte nämlich jeweils der gesamte Argininanteil aus den aeroben, oxidierenden Gewebe in die Muskelgewebe zurücktransportiert werden.

H. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der D-Lactat-, Octopin- und Alanopindehydrogenase im anaeroben Energiestoffwechsel der springenden Herzmuschel C. tuberculatum untersucht.

Im physiologischen Teil wurden die metabolischen Veränderungen im gesamten Weichkörper während biotopbedingter Anaerobiose (anaerobe Inkubation) und funktioneller Anaerobiose (Muskeltätigkeit), sowie in den jeweils darauf folgenden Erholungsphasen untersucht.

1. Die Endprodukte der Glykolyse sind bei biotopbedingter Anaerobiose D-Lactat und L-Alanin. Bei Muskeltätigkeit ist es fast ausschließlich Octopin. Sehr geringe Mengen an Alanopin sind nach langanhaltender Anoxie meßbar, Strombin wird nicht gebildet.
   Die Oxidation des D-Lactats während der Erholung erfolgt nur sehr langsam, während das Octopin innerhalb von wenigen Minuten nach Beendigung der Muskeltätigkeit wieder vollständig oxidiert wird.

2. Die Bildung von Succinat erfolgt vorwiegend aus dem Kohlenstoffgerüst des Asparats, was mit Hilfe spezifischer Stoffwechselinhibitoren gezeigt werden kann. Eine Bildung von Propionat und Acetat erfolgt nicht.

3. Durch den Abbau des Argininphosphats werden bei biotopbedingter Anaerobiose ca. 22%, bei funktioneller Anaerobiose ca. 60% der benötigten Energie bereitgestellt. Die Phosphagenreserven werden während der Erholung rasch wieder aufgefüllt.

4. Die ATP Verbrauchsrate ist bei biotopbedingter Anaerobiose gleichmäßig bei 5% des aeroben Ruhewertes, bei Muskeltätigkeit ist sie dagegen auf das 10fache erhöht.

5. Die Glykolyserate ist bei anaerober Inkubation auf ca. 50% des aeroben Vergleichswertes reduziert, während bei Muskeltätigkeit eine bis zu 100fache Steigerung der Glykolyserate innerhalb von 30 Sekunden erfolgt.

6. Der Sauerstoffverbrauch wird während der Erholung maximal auf den 3.5fachen

Ruhewert gesteigert und bleibt ca. 1 Std. nach Muskeltätigkeit bzw. 12 Std. nach anaerober Inkubation erhöht. Die Abhängigkeit der Sauerstoffschuld von der Anaerobiosedauer und der Anzahl der Fluchtbewegungen wurde untersucht.

Im enzymatischen Teil dieser Arbeit wurden die Pyruvatreduktasen aus Muskelgewebe von C. tubercualtum teilweise gereinigt und ihre kinetischen Eigenschaften untersucht. Weiterhin wurde der Einfluß der Glykogenphosphorylase, der Phosphofructokinase und der Pyruvatkinase auf die Glykolyserate bei biotopbedingter und funktioneller Anaerobiose untersucht, sowie die Regulation der Aktivität dieser Enzyme.

1. In den Muskelgeweben von C. tuberculatum sind vier pyruvatreduzierende Aktivitäten nachzuweisen, die man drei verschieden Enzymen zuordnen kann, nämlich D-Lactat-, Octopin- und Alanopindehydrogenase. Letztere katalysiert auch die Bildung von Strombin.

2. Es konnten zwei Formen der D-LDH durch Gelfiltration getrennt werden: "LDH I" hatte ein Molekulargewicht von ca. 120kDa, "LDH II" eines von ca. 60kDa. Die Rolle von "LDH I" als inaktives Aggregat der "LDH I" wird diskutiert.
   Für ODH und AlDH wurde übereinstimmend ein Molekulargewicht von 40 bis 45kDa bestimmt.
   Von ODH und AlDH wurden jeweils zwei Präparationen von verschiedenen Isoenzymen untersucht, die sich jedoch nicht wesentlich hinsichtlich ihrer kinetischen Eigenschaften unterschieden.

3. Der K_M-Wert der LDH für Pyruvat liegt im Bereich der physiologischen Pyruvatkonzentration, der entsprechende K_M-Wert der AlDH und ODH 5- bzw. 10mal höher.
   Während der K_M-Wert der ODH für Arginin im physiologischen Konzentrationsbereich liegt, ist die Affinität der AlDH zu Alanin und Glycin 10- bzw. sogar 250mal geringer. Diese Diskrepanz wird zur Erklärung der fehlenden Alanopin- und Strombinbildung herangezogen.

4. Vergleicht man die Affinität der terminalen Dehydrogenasen zum Pyruvat mit der zum jeweiligen Reaktionsprodukt, so stellt man fest, daß dei Anhäufung von D-Lactat gegenüber der von Strombin, Alanopin oder Octopin begünstigt

ist. Ebenso liegt das Reaktionsgleichgewicht (K_{eq}) der Strombinbildung deutlicher auf der Seite der Produkte, als das der Alanopin- oder Octopinbildung.

5. Die ermittelten apparenten Gleichgewichtkonstanten der Reaktionen der Pyruvatreduktasen werden in Verbindung mit den in vivo gemessenen D-Lactat- und Aminosäurekonzentrationen zur Erklärung der bei biotopbedingter Anaerobiose vorgefunden D-Lactat-, Octopin- und Alanopinmengen herangezogen. Für die Octopinbildung bei funktioneller Anaerobiose sind die hohen Aktivitäten und die kinetischen Eigenschaften der ODH sowie die geringen Aktivitäten der LDH in Verbindung mit einer stark erhöhten Glykolyserate verantwortlich.

6. Die Glykogenphosphorylase bietet durch ihre vollständige Aktivierung innerhalb von wenigen Sekunden die Voraussetzung für eine rasche und effektive Erhöhung der Glykolyserate bei funktioneller Anaerobiose.

7. Die Umsatzrate der Phosphofructokinase wird durch die Erhöhung der Substratkonzentration und eine höhere Substrataffinität bei erniedrigtem "energy charge" während der funktionellen Anaerobiose mindestens um das 50fache gesteigert.

8. Die Pyruvatkinasereaktion wird anhand der Veränderungen des Massenwirkungsquotienten der beteiligten Substrate und Produkte als limitierender Schritt der Glykolyse bei biotopbedingter und funktioneller Anaerobiose nachgewiesen.
   In Muskel- bzw. Nichtmuskelgewebe von C. tuberculatum wurden zwei gewebsspezifische Enzyme der Pyruvatkinase gefunden, die sich in der Affinität zum Substrat PEP, dem Verlauf der Substratsättigungskurve und der Hemmbarkeit durch Alanin unterscheiden.
   Die Pyruvatkinase aus Nichtmuskelgeweben anaerob inkubierter Muscheln weist eine deutlich verringerte Affinität zum Aktivator Fructosebisphosphat auf. Die Affinität zum Substrat PEP ist nicht verändert.
   Die vorgefundene Regulationsweise der Pyruvatkinase steht im Zusammenhang mit dem Übergang von den Erfordernissen biotopbedingter zu denen funktioneller Anaerobiose.

Literaturverzeichnis

Alberty, R.A.: The relationship between Michaelis constants, maximum velocities and the equilibrium constants for an enzyme-catalyzed reaction. J. Am. Chem. Soc. 75, 1928 - 1932 (1953)

Atkinson, D.E.: The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feed back modifiers. Biochem. 7, 4030 - 4034 (1968)

Baldwin, J.,A.K. Lee und **W.R. England:** The functions of octopine dehydrogenase and D-lactate dehydrogenase in the pedal retractor muscle of the dog whelk, Nassarius coronatus (Gastropoda: Nassaridae). Mar. Biol. 62, 235-238 (1981)

Ballantyne, J.S., P.W. Hochachka und **T.P. Mommsen:** Studies on the metabolism of the migratory squid Loligo opalescens: Enzymes of tissues and heart mitochondria. Mar. Biol. Lett. 2, 75 - 85 (1981)

Bayne, B. und **D.R. Livingstone:** Responses of Mytilus edulis L. to low oxygen tension: acclimation of the rate of oxygen consumption. J. comp. Physiol. 114, 129-142 (1977)

Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Auflage Bd.II. Verlag Chemie, Weinheim, pp 1171-2353 (1974)

Bergmeyer, H.U., E. Bernt, H. Möllering und **G. Pfleiderer:** L-Aspartat und L-Asparagin. In: H.U. Bergmeyer (ed) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd.2, pp. 1741 - 1745. Verlag Chemie, Weinheim (1974)

Bergmeyer, H.U., E. Bernt, F. Schmidt und **H. Stark:** D-Glucose: Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat Dehydrogenase. In: H.U. Bergmeyer (ed) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd.2, pp. 12412 - 1246. Verlag Chemie, Weinheim (1974)

Boyden, C.R.: The behaviour, survival and respiration of the cockles Cerastoderma edule and C. glaucum in air. J. mar. biol. Ass. UK 52, 661-680 (1972)

Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248 - 254 (1976)

Cameselle, J.C., J.L. Sanchez und **A. Carrion:** Thr regulation of gycolysis in the hepatopancreas of the sea mussel Mytilus edulis L. Comp. Biochem. Physiol. 65B, 95 - 102 (1980)

Carlsson, K.H.: Untersuchungen zur Enzymologie und Physiologie des anaeroben Stoffwechsels von Limulus polyphemus im Vergleich mit Cardium edule. Dissertation, Math.-Nat. Fakultät der Universität Bonn.

Carlsson, K.H. und **G. Gäde:** Anaerobic metabolism of the common cockle, Cardium edule - III. Purification and physiological role of D-lactate dehydrogenase from muscle and gill tissue. Comp. Physiol. Biochem. 69B, 715 - 724 (1981)

Carlsson, K.H. und **G. Gäde:** Isolation and characterisation of tissue-specific isoenzymes of D-lactate dehydrogenase from muscle and hepatopancreas of Limulus polyphemus. J. comp. Physiol. B 155, 723 - 731 (1985)

Chih, C.P. und **W.R. Ellington:** Energy metabolism during contractile activity and environmental hypoxia in the phasic adductor muscle of the bay scallop Argopecten irradians concentricus. Physiol. Zool. 56: 623 - 631 (1983)

Chrispeels, J. und **G. Gäde:** Purification and characterisation of pyruvate kinase from the foot muscle of the cockle, Cardium tuberculatum. Comp. Biochem. Physiol. 82B, 163 - 172 (1985)

Cohen, P.: The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. Nature 296, 613 - 620 (1982)

Cohen, P.: Protein phosphorylation and the control of glycogen metabolism in skeletal muscle. Phil. Trans. R. Soc. London B 302, 13 - 25 (1983)

Collicutt, J.M. und **P.W. Hochachka:** The anaerobic oyster heart: coupling of glucose and aspartate fermentation. J. comp. Physiol. 115, 147 - 157 (1977)

Dejours, P.: Principles of comparative respiration physiology. North-Holland Publications Co., Amsterdam (1981)

Ebberink, R.H.M.: Control of the adductor muscle phosphofructokinase activity in the sea mussel Mytilus edulis during anaerobiosis. Mol. Physiol. 2, 345 - 355 (1982)

Ebberink, R.H.M. und **M. Salimans:** Control of glycogen phosphorylase in the posterior adductor muscle of the sea mussel, Mytilus edulis. J. comp. Physiol. 148, 27 - 33 (1982)

Ebberink, R.H.M., und **A. de Zwaan:** Control of glycolysis in the posterior adductor muscle of the sea mussel, Mytilus edulis. J. comp. Physiol. 137, 165 - 171 (1980)

Ebberink, R.H.M., W. Zurburg, und **D.I. Zandee:** The energy demand of the posterior adductor muscle of Mytilus edulis in catch during exposure to air. Mar. Biol. Lett. 1, 23 - 31 (1979)

Eberlee, J.C., J.M. Storey und **K.B. Storey:** Anaerobiosis, recovery from anoxia and the role of strombine and alanopine in the oyster, Crassostrea virginica. Can. J. Zool. 61, 2682 - 2689 (1983)

Ellington, W.R.: The extent of intracellular acidification during anoxia in the catch muscle of two bivalve molluscs. J. exp. Zool. 227, 313 - 317 (1983)

Ellington, W.R.: The recovery from anaerobic metabolism in invertebrates. J. exp. Zool. 228, 431-444 (1983)

Ellington, W.R., und **G.L. Long:** Purification and characterization of a highly unusual tetrameric D-lactate dehydrogenase from the muscle of the giant barnacle, Balanus nubilus Darwin. Arch. Biochem. Biophys. 186, 265 - 274 (1978)

Everse, J., und **N.O. Kaplan:** Lactate dehydrogenase: structure and function. Adv. Enzymol. 37, 61 - 148 (1973)

Famme, P. und **L.H. Kofoed:** The ventilatory current and ctenidial function related to oxygen uptake in declining oxygen tension by the mussel Mytilus edulis. Comp. Biochem. Physiol. 66A, 161-171 (1980)

Fields, J.H.A.: A dehydrogenase requiring alanine and pyruvate as substrates from oyster adductor muscle. Fed. Proc. 37, 1687 (1976)

Fields, J.H.A.: Alternatives to lactic acid: possible advantages. J. exp. Zool. 228, 445 - 457 (1983)

Fields, J.H.A., und **P.W. Hochachka:** Purification and properties of alanopine dehydrogenase from the adductor muscle of the oyster Crassostrea gigas (Mollusca, Bivalvia). Eur. J. Biochem. 114, 615 - 621 (1981)

Fields, J.H.A., und **J.F. Quinn:** Some theoretical considerations on cytosolic redox balance during anaerobiosis in marine invertebrates. J. Theor. Biol. 88, 35 - 45 (1981)

Fischer, E.H.: Cellular regulation by protein phosphorylation. Bull. Inst. Pasteur 81, 7 - 31 (1983)

Foreman, R.A., und **W.R. Ellington:** Effects of inhibitors and substrate supplementation on anaerobic energy metabolism in the ventricle of the oyster Crassostrea virginica. Comp. Biochem. Physiol. 74B, 543 - 547 (1983)

Fyhn, H.J. und **J.D. Costlow:** Anaerobic sampling of body fluids in bivalve mollucs. Comp. Biochem. Physiol. 52A, 265-268 (1975)

Gabbot, P.A.: Energy metabolism. In: B.L. Bayne (ed) Marine mussels. Cambridge University Press. Int. Biol. Program 10, 293 - 355 (1976)

Gäde, G.: Anaerobic metabolism of the common cockle, Cardium edule - I. The utilisation of glycogen and the accumulation of multiple end products. Arch. Int. Physiol. Biochim. 83, 879 - 886 (1975)

Gäde, G.: Biological role of octopine formation in marine molluscs. Mar. Biol. Lett. 1, 121 - 135 (1980a)

Gäde, G.: The energy metabolism of the jumping cockle Cardium tuberculatum: sustained anoxia versus muscular activity. J. comp. Physiol. 137, 177 - 182 (1980c)

Gäde, G.: A comparative study of octopine dehydrogenase isoenzymes in a gastropod, bivalve and cephalopod mollusc. Comp. Biochem. Physiol. 67B, 575 - 582 (1980b)

Gäde, G.: Energy metabolism of arthropods and mollusks during environmental and functional anaerobiosis. J. exp. Zool. 228, 415 - 429 (1983)

Gäde, G.: Arginine and arginine phosphate. In: Methods of Enzymatic Analysis (H.U. Bergmeyer, ed.), Vol. VIII, pp. 425 - 431, Verlag Chemie, Weinheim (1985a)

Gäde, G.: Octopine. In: Methods of Enzymatic Analysis (H.U. Bergmeyer, ed.), Vol. VIII, pp. 419 - 425, Verlag Chemie, Weinheim (1985b)

Gäde, G., und K.H. Carlsson: Purification and characterisation of octopine dehydrogenase from the marine nemertean Cerebratulus lacteus (Anopla: Heteronemeretea): comparison with scallop octopine dehydrogenase. Mar. Biol. 79, 39 - 45 (1984)

Gäde, G., und W.R. Ellington: The anaerobic molluscan heart: adaptation to environmental anoxia. Comparison with energy metabolism in vertebrate hearts. Comp. Biochem. Physiol. 76A, 615 - 620 (1983)

Gäde, G. und M.K. Grieshaber: Partial purification and properties of octopine dehydrogenase and the formation of octopine in Anodonta cygnea L. J. Comp. Physiol. 102, 149 - 158 (1975)

Gäde, G. und M.K. Grieshaber: Anaerobic metabolism of the common cockle Cardium edule - II. Partial purification and properties of lactate dehydrogenase and octopine dehydrogenase. A comparative study. Arch. Int. Physiol. Biochim. 84, 735 - 752 (1976)

Gäde, G. und M.K. Grieshaber: Pyruvate reductases catalyze the formation of lactate and opines in anaerobic invertebrates. Comp. Physiol. Biochem. (in press) (1986)

Gäde, G. und E. Zebe: Über den Anaerobiosestoffwechsel von Molluskenmuskeln. J. comp. Physiol. 85, 291 - 301 (1973)

Gäde, G., K.H. Carlsson und G. Meinardus: Energy metabolism in the foot of the marine gastropod Nassa mutabilis during environmental and functional anaerobiosis. Mar. Biol. 80, 49-56 (1984)

Gäde, G., E. Weeda und P.A. Gabbot: Changes in the level of octopine during the escape responses of the scallop Pecten maximus L. J. comp. Physiol. 124, 121-127 (1978)

Gäde, G., H. Wilps, J.H.F.M. Kluytmans und A. de Zwaan: Glycogen degradation and end products of anaerobic metabolism in the fresh water bivalve Anodonta cygnea. J. comp. Physiol. 104, 79-85 (1975)

Goldsworthy, G.J., und G. Gäde: The chemistry of hypertrehalolsemic factors. In: R.G.H. Downer und H. Laufer (eds) Endocrinology of insects, pp. 109 - 119 (1983)

Graßl, M.: L-Alanin. In: H.U. Bergmeyer (ed) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd.2, pp. 1727 - 1730. Verlag Chemie, Weinheim (1974a)

Graßl, M.: D-Alanin. In: H.U. Bergmeyer (ed) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd.2, pp. 1730 - 1734. Verlag Chemie, Weinheim (1974b)

Grieshaber, M.K.: Metabolic regulations of energy metabolism. In: A. Addinck and N. Spronk (eds) Exogenous and endogenous influences on metabolic and neural control, pp. 225 - 242. Pergamon Press, Oxford (1982)

Hakim, G., E. Carpene, P. Cortesi und **G. Isani:** Regulation by phosphorylation - dephosphorylation of pyruvate kinase in Venus gallina and Scopharca inequivalis. Comp. Biochem. Physiol. 80B, 109 - 112 (1985)

Herreid, C.F.: Hypoxia in invertebrates. Comp. Physiol. Biochem. 67A, 311-320 (1980)

Hers, H.G.: The discovery and the biological role of fructose-2,6-bisphosphate. Biochem. Soc. Transactions 12,729 - 735 (1984)

Hochachka, P.W.: Fuels and pathways as designated systems for support of muscular work. J. exp. Biol. 115, 149 - 164 (1985)

Hochachka, P.W., J.A.H. Fieldsa und **T.P. Mommsen:** Metabolic and enzyme regulation during rest-to-work transition: a mammal versus mollusc comparison. In: P.W. Hochachka (ed) The Mollusca, Vol. 1: Metabolic biochemistry and molecular biomechanics. Academic Press, New York, pp 55 - 87 (1983)

Holwerda, D.A. und **A. de Zwaan:** Fumerate reductase of Mytilus edulis L. Mar. Biol. Lett. 1, 33 - 40 (1979)

Holwerda, D.A., P.R. Veenhof, H.A.A. van Heugten und **I.D. Zandee:** Modification of mussel pyruvate kinase during anaerobiosis and after temperature acclimation. Mol. Physiol. 3, 225 - 234 (1983)

Jaworeck, D, W. Gruber und **H.U. Bergmeyer:** Adenosin-5´-diphosphat und Adenosin-5´-monophosphat. In: H.U. Bergmeyer (ed) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd.2, pp. 179 - 2181. Verlag Chemie, Weinheim (1974)

Kacser, H., und **J.A. Burns:** Molecular Democracy: Who shares the controls? Symp. Soc. Exp. Biol. 27, 65 - 104 (1973)

Keppler, D. und **K. Decker:** Glykogen: Bestimmung mit Amyloglucosidase. In: H.U. Bergmeyer (ed) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd.2, pp. 1171 - 1176. Verlag Chemie, Weinheim (1974)

Kluytmans, J.H., P.R. Veenhof und **A. de Zwaan:** Anaerobic production of volatile fatty acids in the sea mussel, Mytilus edulis. J. comp. Physiol. 104, 71-78 (1975)

Kluytmans, J.H., A.M.T. de Bont, E.C.J. Kruitwagen, H.J.L. Ravestein und P.R. Veenhof: Anaerobic capacities and anaerobic energy production of some mediterranean bivalves. Comp. Physiol. Biochem. 75B, 171-179 (1983)

Lamprecht, W. und **I. Trautschold:** ATP, Bestimmung mit Hexokinase und Glucose- 6-phosphatdehydrogenase. In: H.U. Bergmeyer (ed) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd.2, pp. 151 - 2159. Verlag Chemie, Weinheim (1974)

Lehninger, A.L.: Biochemistry. Worth Publishers, New York (1975)

Livingstone, D.R.: Energy production in the muscle tissues of different kinds of molluscs. In: Exogenous and endogenous influences on metabolic and neural control. Addinck A and Spronk N (eds), pp 257 - 274. Oxford: Pergamon Press (1982)

Livingstone, D.R.: Invertebrate and vertebrate pathways of anaerobic metabolism: evolutionary considerations. J. Geol. Soc. 140, 27-37 (1983)

Livingstone, D.R., A. de Zwaan, M. Leopold und **E. Marteijn:** Studies on the phylogenetic distribution of pyruvate oxidoreductases. Biochem. System. Ecol. 11, 415 - 425 (1983)

Long, G.L., und **N.O. Kaplan:** D-lactate specific pyridine nucleotide lactate dehydrogenase in animals. Science 162, 685 - 686 (1968)

Lowry, H.O. und **J.V. Passonneau:** A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press, New York & London (1972)

Mangum, C. und **W. van Winkle:** Responses of aquatic invertebrates to declining oxygen conditions. Amer. Zool. 13, 529-541 (1973)

Meinardus, G. und **G. Gäde:** Anaerobic metabolism of the common cockle Cardium edule - IV. Time dependent changes of metabolites in the foot and gill tissue induced by anoxia and electrical stimulation. Comp. Physiol. Biochem. 70B, 271 - 277 (1981)

Nicchitta, C.V. und **W.R. Ellington:** Energy metabolism during air exposure and recovery in the high intertidal bivalve mollusc Geukensia demissa granossisima and the subtidal bivalve mollusc Modiolus squamosus. Biol. Bull. 165, 708-722 (1983)

Nicchitta, C.V. und **W.R. Ellington:** Partial purification and characterisation of a strombine dehydrogenase from the adductor muscle of the mussel, Modiolus squamosus. Comp. Biochem. Physiol. 77B, 233 - 236 (1984)

Noll, F.: D-Lactat. In: H.U. Bergmeyer (ed) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd.2, pp. 1521 - 1525. Verlag Chemie, Weinheim (1974)

Plaxton, W.C. und **K.B. Storey:** Alanopine dehydrogenase: purification and characterisation of the enzyme from Littorina littorea foot muscle. J. comp. Physiol. 149, 57 - 65 (1982)

Plaxton, W.C. und **K.B. Storey:** Purification and properties of alanopine dehydrogenase isoenzymes from the channeled whelk, Busycotypus canaliculatum. Comp. Biochem. Physiol. 76B, 321 - 326 (1983)

Plaxton, W.C., und **K.B. Storey:** Purification and properties of aerobic and anoxic forms of pyruvate kinase from red muscle tissue of the channelled whelk, Busycotypus canaliculatum. Eur. J. Biochem. 143, 257 - 265 (1984)

Pörtner, H.O., M.K. Grieshaber und **N. Heisler:** Anaerobiosis and acid-base status in marine invertebrates: effect of environmental hypoxia on extracellular and intracellular pH in Sipunculus nudus L. J. comp. Physiol. 155, 13 - 20 (1984)

Pörtner, H.O., N. Heisler und **M.K. Grieshaber:** Oxygen consumption and mode of energy production in the intertidal worm Sipunculus nudus L.: Definition and characterisation of the critical Po_2 for an oxyconformer. Respiration Physiol. 59, 361-377 (1985)

Pörtner, H.O., U. Kreutzer, B. Siegmund, N. Heisler und **M.K. Grieshaber:** Metabolic adaptation of the intertidal worm Sipunculus nudus to functional and environmental hypoxia. Mar. Biol. 79, 237 - 247 (1984)

Prosser, C.L.: Comparative Animal Physiology. W.B. Sounders Company, Philadelphia (1973)

Regnouf, F. und **N.V. Thoai:** Octopine and lactate dehydrogenase in mollusc muscles. Comp. Biochem. Physiol. 32, 411 - 416 (1970)

Reitze, M.: Untersuchungen über Alanopindehydrogenase und Strombindehydrogenase bei Polychaeten. Diplomarbeit, Universität Münster, F.R.G. (1983)

Rognstad, R.: Rate limiting steps in metabolic pathways. J. Biol. Chem. 254, 1875 - 1878 (1979)

Rollestone, F.S.: A theoretical background to the use of measured concentrations of intermediates in study of the control of intermediate metabolism. Curr. Top. Cell. Regul. 5, 47 - 75 (1972)

Rudolph, F.B., und **H.J. Fromm:** Plotting methods for analyzing enzyme rate data. In: S.P. Colowick und N.O. Kaplan (eds) Methods in Enzymology, Vol. 63. Academic Press, New York, pp 138 - 159 (1979)

Sanchez, J.L., M. Abad, L.O. Garcia-Martin und **A. Galarza:** Pyruvatekinase from the hepatopancreas of Mytilus galloprovincialis: Interaction with its allosteric effectors. Comp. Biochem. Physiol. 80B, 577 - 582 (1985)

Schiedek, D.: Untersuchungen über den Stoffwechsel der Messermuschel Ensis directus. Diplomarbeit Universität Münster (1985)

Schöttler, U.: Vergleichende Untersuchungen zum Anaerobiosestoffwechsel von Polychaeten. Habilitationsschrift Universität Münster (1982)

Schroff, G. und **U. Schöttler:** Anaerobic reduction of fumarate in the body wall musculature of Arenicola marina (Polychaeta). J. comp. Physiol. 116, 325 - 336 (1977)

Schroff, G. und **E. Zebe:** The anaerobic formation of propionic acid in the mitochondria of the lugworm Arenicola marina (Polychaeta). J. comp. Physiol. 138, 35 - 41 (1980)

Schulz, Th. K. F., J. H. Kluytmans und **D. I. Zandee:** In vitro production of propionic acid in the mantle mitochondria of the sea mussel Mytilus edulis L. Abstracts of the 3rd Congress of ESCPB, S. 126 - 127, Pergamon Press, Oxford (1981)

Sedlmeier, D.: Mode of action of the crustacean hyperglycaemic hormone. Amer. Zool. 25, 223 - 232 (1985)

Siebenaller, J.F.: Regulation of pyruvate kinase in Mytilus edulis by phosphorylation - dephosphorylation. Mar. Biol. Lett. 1, 105 - 110 (1979)

Siegmund, B., und **M.K. Grieshaber:** Determination of meso-alanopine and D-strombine by high pressure liquid chromatography in extracts from marine invertebrates. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 807 - 812 (1983)

Siegmund, B., M.K. Grieshaber, M. Reitze und **E. Zebe:** Alanopine and strombine are end products of anaerobic glycolysis in the lugworm, Arenicola marina L. (Annelida, Polychaeta). Comp. Biochem. Physiol. 82B, 337 - 345 (1985)

Simpson, J. W., K. Allen und **J. Awapara:** Free amino acids in some aquatic invertebrates. Biol. Bull. 117, 371 - 381 (1959)

Storey, K.B.: Purification and properties of adductor muscle phosphofructokinase from the oyster, Crassostrea virginica. Eur. J. Biochem. 70, 331 - 337 (1976)

Storey, K.B.: Tissue specific alanopine deydrogenase and strombine dehydrogenase from the sea mouse, Aphrodite aculeata (Polychaeta). J. exp. Zool. 225, 369 - 378 (1983)

Storey, K.B.: Phosphofructokinase from foot muscle of the whelk, Busycotypus canaliculatum: evidence for covalent modificaton of the enzyme during anaerobiosis. Arch. Biochem. Biophys. 225, 665 - 672 (1984)

Storey, K.B.: Fructose-2,6-phosphate and anaerobic metabolism in marine molluscs. FEBS-Letters 181, 245 - 248 (1985)

Storey, K. B. und **P. W. Hochachka:** Squid muscle pyruvate kinase: Control properties in a tissue with active alpha G. P. cycle. Comp. Biol. Physiol. 52B, 187 - 193 (1975)

Storey, K.B., und **J.M. Storey:** Energy metabolism in the mantle muscle of the squid, Loligo pealeii. J. comp. Physiol. 123, 169 - 175 (1978)

Storey, K. B. und **J. M. Storey:** Kinetic characterization of tissue-specific isoenzymes of octopine dehydrogenase from mantle muscle and brain of Sepia officinalis. Eur. J. Biochem. 93, 545 - 552 (1979)

Storey, K.B., und **J.M. Storey:** Octopine metabolism in the cuttlefish, Sepia officinalis: octopine production by muscle and its role as an aerobic substrate for non-muscular tissues. J. comp. Physiol. 131, 311 - 319 (1980)

Taylor, A.C.: Burrowing behaviour and anaerobiosis in the bivalve Arctica islandica L. J. mar. biol. Ass. U.K. 56, 95-109 (1976)

Taegtmeyer, H.: Metabolic responses to cardiac hypoxia. Increased production of succinate by rabbit peppillary muscles. Circulation Res. 43, 808 - 815 (1978)

Trausch, G., und **A. Bauchau:** Phosphorylation and dephosphorylation of purified pyruvate kinase isolated from the hepatopancreas of the lobster (Homarus americanus). Mol. Physiol. 5, 332 - 343 (1984)

Vazques-Baanante, I., und **M. Rosell-Perez:** In vitro studies of Pecten maximus glycogen phosphorylase and the interconversion of their forms. Comp. Biochem. Physiol. 62B, 381-387 (1979)

de Vooys, C.G.N., und **A. de Zwaan:** The rate of oxygen consumption and amonia excretion by Mytilus edulis after various periods of exposure to air. Comp. Physiol. Biochem. 60, 343-347 (1978)

Weber, H.: Ein Umdreh- und Fluchtreflex bei Nassa mutabilis. Zool. Anz. 60, 261 - 269 (1924)

Widdows, J., B.L. Bayne, D.R. Livingstone, R.I.E. Newell und **P. Donkin:** Physiological and Biochemical responses of bivalve molluscs to exposure to air. Comp. Physiol. Biochem. 62A, 301-308 (1979)

Wienhausen, G.: Anaerobic formation of acetate in the lugworm Arenicola marina. Naturwissenschaften 68, 206 (1981).

Williamson, D.H.: L-Alanin. In: H.U. Bergmeyer (ed) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd.2, pp. 1724 - 1727. Verlag Chemie, Weinheim (1974)

Williamson, J.R.: Succinat. In: H.U. Bergmeyer (ed) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd.2, pp. 1759 - 1762. Verlag Chemie, Weinheim (1974)

Zandee, D.I., D.A. Holwerda und **A. de Zwaan:** Energy metabolism in bivalves and cephalopods. In: R. Gilles (ed) Animals and environmental fitness. pp. 185 - 206 Pergamon Press, Oxford (1980)

Zebe, E., M.K. Grieshaber und **U. Schöttler:** Biotopbedingte und funktionsbedingte Anaerobiose. Der Energiestoffwechsel wirbelloser Tiere bei Sauerstoffmangel. Biologie in unserer Zeit 10, 175 - 182 (1980)

Ziegler, R., M. Ashida, A.M. Fallon, L.T. Wimer, S.S. Wyatt und **G.R. Wyatt:** Regulation of glycogen phosphorylase in fat body of cecropia silkmoth pupae. J. comp. Physiol. 131, 321 - 332 (1979)

de Zoeten, L. W. und **J. Tipker:** Intermediary metabolism of the liver fluke Fasciola hepatica: II. Hydrogen transport and phosphorylation. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 691 - 695 (1969)

Zs-Nagy,I.: Cytosomes (yellow pigment granules) of molluscs as cell organelles of anoxic energy production. Int. Rev. Cytol. 49, 331 - 377 (1977)

Zurburg, W., J. H. Kluytmans, H. Pieters und **D. J. Zandee:** The influence of seasonal changes on energy metabolism in Mytilus edulis L.: II. Organ specifity. In: E. Nayler und R. G. Hartnoll (eds.) Cyclic phaenomena in marine plants and animals, pp. 293 - 300, Pergamon Press, Oxford (1979)

Zurburg, W., A.M.T. de Bont und **A. de Zwaan:** Recovery form exposure to air and the occurance of strombine in different organs of the sea mussel, Mytilus edulis. Mol. Physiol. 2, 135 - 164 (1982)

de Zwaan, A.: Anaerobic energy metabolism in bivalve molluscs. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 15, 103 - 187 (1977)

de Zwaan, A.: Carbohydrate metabolism in bivalves. In: P.W. Hochachka (ed) The Mollusca, Vol 1: Metabolic biochemistry and molecular biomechanics. Academic Press, New York, pp. 137 - 175 (1983)

de Zwaan, A., und **P.R. Dando:** Phosphoenolpyruvate-pyruvate metabolism in bivalve molluscs. Mol. Physiol. 5, 285 - 310 (1984)

de Zwaan, A., und **T.C.M. Wijsman:** Anaerobic metabolism in Bivalvia (Mollusca). Comp. Biochem. Physiol. 54B, 313 - 324 (1976)

de Zwaan, A., J.H.F.M. Kluytmans und **D.I. Zandee:** Facultative anaerobiosis in molluscs. Biochem. Soc. Symp. 41, 133 - 168 (1976)

de Zwaan, A., R.J. Thompson und **D.R. Livingstone:** Physiological and biochemical aspects of the valve snap and valve closure responses in the giant scallop Placopecten magellanicus - II. Biochemistry. J. comp. Physiol. 137, 105-115 (1980)

de Zwaan, A., A.M.T. de Bont und **A. Verhoeven:** Anaerobic energy metabolism in isolated adductor muscle of the sea mussel Mytilus edulis L. J. comp. Physiol. 149, 136 - 143 (1982)

de Zwaan, A., A.M.T. de Bont und **J. Hemelraad:** The role of phosphoenolpyruvate carboxykinase in the anaerobic metabolism of the sea mussel, Mytilus edulis L. J. comp. Physiol. 153, 267 - 274 (1983)

de Zwaan, A., A.M.T de Bont, W. Zurburg, B.L. Bayne und **D.R. Livingstone:** On the role of strombine formation in the energy metabolism of the adductor muscle of a sessile bivalve. J. comp. Physiol. 149, 557-563 (1983)

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-5´-diphosphat
AK	Argininkinase
AlDH	Alanopindehydrogenase
AMP	Adenosin-5´-monophosphat
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
CoA	Coenzym A
CS	Citratsynthase
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
DTT	Dithiotreothol
"e.c."	"energy charge"
E.C.	"international enzyme code"
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinucleotid, reduziert
FADH	Flavinadenindinucleotid, oxidiert
FBP	Fructose-1,6-bisphosphat
F-6-P	Fructose-6-phosphat
F-2,6-P	Fructose-2,6-phosphat
GAP	Glycerinaldehydphosphat
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
G-1-P	Glucose-1-phosphat
G-6-P	Glucose-6-phosphat
G6PDH	Glucose-6-phosphatdehydrogenase
h	Hill-Koeffizient
HK	Hexokinase
ICDH	Isocitratdehydrogenase
IDP	Inosindiphosphat
ITP	Inosintriphosphat
kDa	Kilo-Dalton
K_{eq}	Gleichgewichtskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LDH	Lactatdehydrogenase
MAR	"mass action ratio" = Massenwirkungsquotient
MDH	Malatdehydrogenase
MK	Myokinase
NAD^+	Nicotinadenindinucleotid, reduziert
NADH	Nicotinadenindinucleotid, oxidiert
NADP	Nicotinadenindinucleotidphosphat, reduziert
ODH	Octopindehydrogenase
P_i	Orthophosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
PFK	Phosphofructokinase
3-PG	3-Phosphoglycerat
PGK	Phosphoglyceratkinase
PGM	Phosphoglyceratmutase
PGlI	Phosphoglyceratisomerase
PGlM	Phosphoglyceratmutase
PK	Pyruvatkinase
Po_2	Sauerstoffpartialdruck
StDH	Strombindehydrogenase
TRA	Triethanolamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Lebenslauf

Name:	Georg Meinardus-Hager (geb. Meinardus)
Geboren:	20.10.1955 in Brake/Unterweser (Keis Wesermarsch)
Familienstand:	verheiratet
Vater:	Günther Meinardus, geb. 1928, Landwirt
Mutter:	Johanna Meinardus, geb. Eylers, geb. 1930
Abitur:	Juni 1974 Gymnasium Varel (Oldenburg)
Studium:	Wintersemester 1974/75 bis Sommersemester 1980 Studium der Biologie an der Universität Bonn
Prüfungen:	August 1976 Vordiplom Oktober 1980 Diplom in Biologie mit einer experimentellen Arbeit: "Untersuchungen zum Anaerobiose-Stoffwechsel der Herzmuschel Cardium edule L."
Berufsbezogene Tätigkeiten:	Vom 1.9.1980 bis 30.9.1985 im Rahmen eines DFG-Schwerpunkt-Programms wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Zoophysiologie der Universität Bonn und des Instituts für Zoologie IV der Universität Düsseldorf.